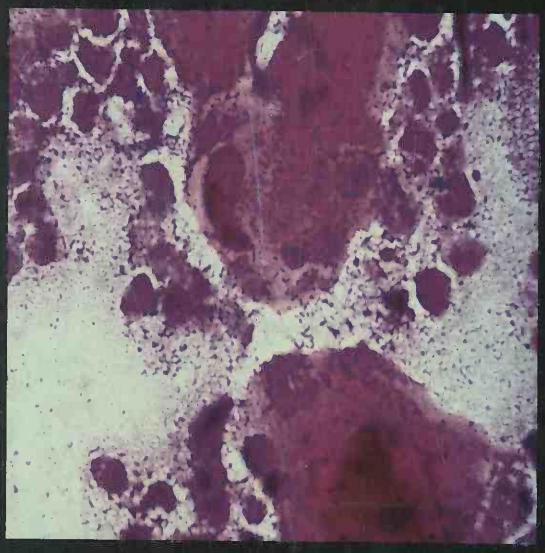
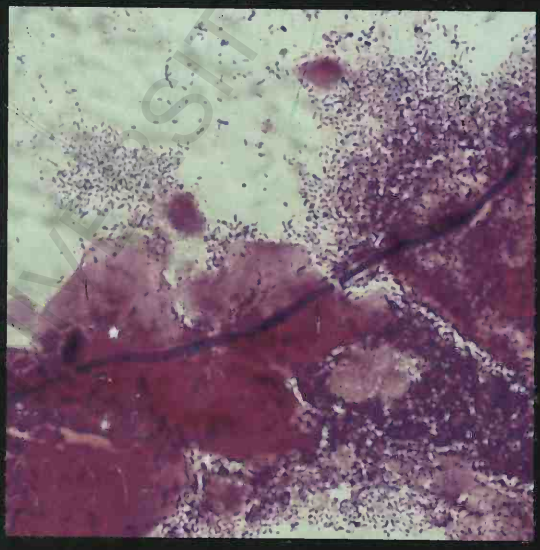
Mariana Carmen Chifiriuc Grigore Mihăescu Veronica Lazăr

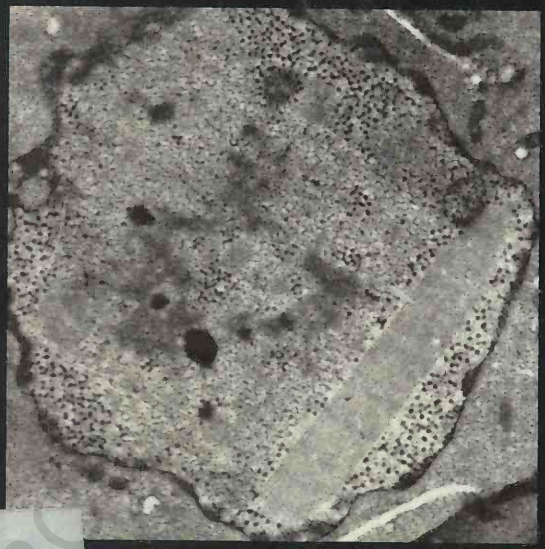
MICROBIOLOGIE ŞI VIROLOGIE MEDICALĂ

Ediția a doua

Vol. II







-V-
6682

editura universităţii din bucureşti

V-6682

CARMEN CHIFIRIUC GR. MIHĂESCU VERONICA LAZĂR

MICROBIOLOGIE SI VIROLOGIE MEDICALA

Ediția a doua

Vol. II

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

Cuvânt înainte .....
PARTEA I. BACTERIOLOGIE MEDICALĂ 13
INTRODUCERE 13
1. SCURT ISTORIC AL MICROBIOLOGIEI MEDICALE 14
2. STRUCTURA şi FUNCŢIILE CELULEI BACTERIENE 20
2.1. Peretele celular 20
2.1.1. Structura moleculară a peretelui celular la bacteriile Gram pozitive 21
2.1.2. Peretele celular la bacteriile Gram negative 24
2.1.3. Peretele celular la Archaea 24
2.1.3.1. Structura chimică a moleculei de LPS 26
2.1.3.2. Spaţiul periplasmic 27
2.1.4. Peretele celular acido-rezistent al micobacteriilor 28
2.1.5. Funcţiile peretelui celular 28
2.1.6. Protoplaştii 29
2.2. Membrana plasmatică 30
2.2.1. Structura membrane plasmatice 30
2.2.2. Funcţiile membranei plasmatice 34
2.2.3. Mecanismele fiziologice ale permeabilităţii membranei 34
2.3. Mezosomul 35
2.4. Citoplasma 36
2.5. Nucleoidul bacterian 37
2.54.1. Organizarea fizică a cromosomului 37
2.6. Ribosomii 39
2.6.1. Particularităţile sintezei proteinelor la bacterii 40
2.6.2. Secreţia proteinelor extracelulare la bacterii 41
2.7. Sporul 43
2.7.1. Structura internă a endosporului 45
2.7.2. Particularităţile biochimice ale sporului 45
2.8. Incluziile 46
2.9. Glicocalixul 47
2.9.1. Capsula 47
2.9.1.1. Natura chimică a materialului capsular 48
2.9.2. Glicocalixul comportamental 49
2.10. Flagelul 51
2.10.1. Structura flagelului 51
2.10.2. Motilitatea şi chimiotaxia 52
2.11. Fimbriile 52
2.12. Pilii 54
2.13. Dinamica unei culturi bacteriene discontinui 54
2.14. Metabolismul bacterian 58
2.14.1. Particularităţile generale ale metabolismului bacterian 58
2.14.2. Metabolismul energetic bacterian 59
2.14.3. Tipuri de metabolism energetic in funcţie de acceptorul final de electroni 59
2.14.3.1. Respiraţia aerobă bacteriană 61
2.14.3.2. Respiraţia anaerobă 63
2.14.3.3. Fermentaţia 64
2.14.4. Catabolismul lipidelor 68
2.14.5. Catabolizarea compuşilor organici cu azot 68
2.14.6. Catabolismul compuşilor aromatici 69

BCU "IOAN SLAVICI" UNIVERSITY LIBRARY

3. MICROBIOTA NORMALĂ A ORGANISMULUI UMAN 71
3.1. Colonizarea şi succesiunea microorganismelor la om 72
3.2. Microbiota normală a tractului respirator şi a cavităţii orale 73
3.2.1. Implicaţiile microbiotei orale în patologia dentară 75
3.3. Habitatele microbiotei gastrointestinale 80
3.4. Microbiota normală a tractului urogenital 83
3.5. Microbiota normală a pielii 84
3.6. Microorganismele probiotice 84
3.7. Gnotobioza şi animalele gnotobiotice 85
3.7.1. Caracteristicile animalelor "*germ-free*" 85
3.8. Rolurile microbiotei normale 86
4. PROPRIETĂŢILE MICROORGANISMELOR PATOGENE: PATOGENITATEA ŞI VIRULENŢA BACTERIANĂ 88
4.1. Definiţii 88
4.2. Infecţiozitatea 90
4.2.1. Adezinele bacteriene 90
4.2.2. Biofilmele microbiene 94
4.3. Sideroforii – factori de virulenţă 99
4.4. Agresivitatea (Invazivitatea) 103
4.5. Toxigenitatea 106
4.6. Proprietăţi metabolice particulare implicate în virulenţa bacteriană 123
4.7. Reglarea expresiei factorilor de virulenţă 126
4.8. Evoluţia bacteriilor patogene 127
4.9. Relaţia dintre patogenitate şi parazitism 128
4.10. Microorganismele oportuniste 129
5. EVOLUŢIA PROCESULUI INFECŢIOS 130
5.1. Etapele procesului infecţios 130
5.2. Condiţiile de apariţie a procesului infecţios 141
5.3. Modalităţi de evoluţie a procesului infecţios 144
6. COCI PIOGENI DE IMPORTANŢĂ MEDICALĂ 147
6.1. Coci Gram pozitivi, catalază pozitivi, aerobi de importanţă medicală. Familia *Micrococcaceae* 147
6.1.1. Genul *Staphylococcus* 147
6.2. Coci Gram pozitivi, catalazănegativi, de importanţă medicală. Familia *Streptococcaceae* 162
6.2.1. *Streptococcus pyogenes* 163
6.2.2. *Streptococcus agalactiae* 168
6.2.3. *Streptococii de grup C şi G* 169
6.2.4. *Streptococcus pneumoniae* 169
6.2.5. Genul *Enterococcus* 172
6.2.6. Alte genuri şi specii de streptococi 176
6.2.7. Diagnosticul bacteriologic al infecţiilor streptococice 177
6.3. Coci piogeni Gram negativi de importanţă medicală – Familia *Neisseriaceae* 180
6.3.1. Genul *Neisseria* 180
6.3.1.1. *Neisseria gonorrhoeae* 182
6.3.1.2. *N. meningitidis* 185
6.3.1.3. *Alte specii de Neisseria* 186
6.3.2. *Moraxella catarrhalis* 187
6.3.3. *Kingella denitrificans* 187
7. BACILI GRAM NEGATIVI DE IMPORTANŢĂ MEDICALĂ 189
7.1. Familia *Enterobacteriaceae* 189
7.1.1. Genul *Escherichia* 191
7.1.2. Genul *Salmonella* 199
7.1.3. Genul *Shigella* 206
7.1.4. *Citrobacter freundii* 211
7.1.5. Grupul *Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Serratia* (KEHS) 211
7.1.6. Grupul *Proteus Morganella Providencia* 212
7.1.7. Genul *Edwardsiella* 214
7.1.8. Genul *Levinea (Citrobacter) malonatica* 214
7.1.9. Genul *Kluyvera* 214
7.1.10. Genul *Buttiauxella* 214
7.1.11. Genul *Yersinia* 215

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7.2. **Bacili Gram negativi nonfermentativi opportunisti** 219
7.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* 220
7.2.2. *Ps. Mallei* 226
7.2.3. *Ps. (Burkholderia) pseudomallei* 226
7.2.4. *Burkholderia cepacia* 226
7.2.5. *Stenotrophomonas maltophilia* 228
7.2.6. Genul *Acinetobacter* 228
7.2.7. Alte specii de bacili Gram negativi 230
7.3. **Familia *Pasteurellaceae*** 233
7.3.1. Genul *Pasteurella* 233
7.3.2. Genul *Haemophylus* 234
7.4. ***Bordetella pertussis*** 237
7.5. **Genul *Brucella*** 240
7.6. ***Francisella tularensis*** 241
7.7. ***Legionella*** 244
8. **BACILI GRAM POZITIVI SPORULAȚI. FAMILIA *BACILLACEAE*** 248
8.1. ***Bacillus anthracis*** 249
8.2. ***B. cereus*** 250
8.3. **Genul *Clostridium*** 251
9. **BACILI GRAM POZITIVI NESPORULAȚI** 262
9.1. Genul *Corynebacterium* 262
9.2. Genul *Listeria* 265
9.3. *Erysipelothrix rusiopathiae* 270
10. **ACTINOBACTERII** 271
10.1. ***Nocardia asteroides*** 271
10.2. **Genul *Mycobacterium*** 272
11. **INFECȚII PRODUSE DE BACTERII ANAEROBE REZIDENTE ÎN MICROBIOTA NORMALĂ** 281
12. **BACTERII SPIRALATE DE IMPORTANȚĂ MEDICALĂ** 285
12.1. **Vibrioni. Familia *Vibrionaceae*** 285
12.1.1. Genul *Vibrio* 285
12. 1.2. Genul *Aeromonas* 292
12.1.3. Genul *Photobacterium* 294
12.2. **Spirili** 294
12.2.1. *Campylobacterii* 294
12.2.2. Familia *Helicobacteriaceae* 298
12.3. **Spirochete** 302
12.3.1. *Borrelia* 303
12.3.2. *Treponema* 306
12.3.3. *Leptospira* 310
13. **BACTERII STRICT INTRACELULARE** 315
13.1. ***Chlamidii*** 317
13.2. ***Ricketsii*** 321
13.3. ***Coxiella burnetii*** 322
13.4. **Genul *Ehrlichia*** 323
14. **MICOPLASME** 324
15. **DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR MICROBIENE** 328
15.1. **Noțiuni de asigurarea calității în bacteriologia clinică** 328
15.2. **Tipuri de produse patologice recoltate în scopul unei analize microbiologice** 348
15.3. **Analiza bacteriologică a probelor din tractul respirator** 352
15.4. **Analiza bacteriologică a probelor din tractul respirator inferior** 355
15.5. **Examenul citobacteriologic al urinii (ECU)** 357
15.6. **Examenul bacteriologic al secrețiilor și exsudatelor ano-genitale** 360
15.7. **Diagnosticul bacteriologic al materiilor fecale. Coprocultura** 363
15.8. **Hemocultura** 367
15.9. **Examenul bacteriologic al dispozitivelor intravasculare (catetere, camere implantabile)** 372
15.10. **Examenul citochimic și bacteriologic al lichidului cefalorahidian** 373
15.11. **Examenul bacteriologic al lichidelor de puncție (lichide purulente, serozități)** 376
15.12. **Analiza microbiologică a exsudatelor purulente, a secrețiilor de plagă și a abceselor** 377
15.13. **Examenul bacteriologic al lichidului de dren** 379
15.14. **Examenul bacteriologic al prelevatelor oculare** 379

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

15.15. Examenul bacteriologic al prelevatelor perinatale 381
15.16. Izolarea şi identificarea bacteriilor anaerobe 382
15.17. Diagnosticul infecţiilor cu micobacterii 384
15.18. Evidenţierea potenţialului de patogenitate şi virulenţă prin teste *in vitro* 388
16. TERAPIA ANTIMICROBIANĂ 395

PARTEA A II-A. VIROLOGIE MEDICALĂ
17. NOŢIUNI INTRODUCTIVE 432
17.1. Modelul general de structură a virionului 433
17.1.1. Capsida 434
17.1.2. Învelişul viral (peplosul) 434
17.1.3. Genomul viral. Organizarea fizică 435
17.1.4. Genomuri virale ARN segmentate 437
17.1.5. Modalităţi particulare de codificare a informaţiei genetice la virusuri 437
17.1.6. Infecţiozitatea acizilor nucleici 440
17.2. Definirea conceptului modern de virus 440
17.3. Natura virusurilor 441
17.4. Simetria virusurilor 443
17.4.1. Simetria helicală 444
17.4.2. Simetria icozaedrică 444
17.4.3. Probleme legate de modul de construcţie a virionilor icozaedrici 445
17.4.4. Simetria binară 446
18. MULTIPLICAREA VIRUSURILOR 447
18.1. Iniţierea procesului infecţios 449
18.2. Pătrunderea virusului în celulă (infecţia propriu-zisă) 450
18.3. Sinteza ARNm viral 453
18.3.1. Sinteza ARNm la dezoxiribovirusuri 454
18.3.2. Originea ARNm la ribovirusuri 455
18.4. Biosinteza proteinelor virale timpurii 457
18.5. Replicarea genomului viral ADN 457
18.6. Replicarea şi transcrierea genomului viral ARN 461
18.6.1. Replicarea şi transcrierea ARN printr-un intermediar ADN 463
18.7. Biosinteza proteinelor tardive 464
18.7.1. Transportul şi prelucrarea proteinelor 465
18.8. Asamblarea (morfogeneza) şi eliberarea virionilor 464
19. TIPURI DE RELAŢII VIRUS-CELULĂ 469
19.1. Patologia celulelor infectate cu virusuri 470
19.2. Mecanismele moleculare ale efectului citopatic 471
19.2.1. Modificări metabolice 471
19.2.1.1. Modificări ale metabolismului acizilor nucleici celulari 472
19.2.1.2. Modificări ale metabolismului proteinelor celulare 473
19.2.2. Pierderea funcţiilor membranelor celulare 474
19.2.3. Modificări ale citoscheletului 475
19.2.4. Apoptoza 475
19.2.5. Apariţia corpilor de incluzie 476
20. RELAŢII DINTRE VIRUSURI ŞI ORGANISME 477
20.1. Căile de intrare a virusurilor 477
20.2. Tropismul viral 479
20.2.1. Neurotropismul 479
20.2.2. Enterotropismul 481
20.3. Tipuri de infecţii *in vivo* 482
20.3.1. Persistenţa virală 483
20.3.2. Mecanismele persistenţei virale 484
20.3.3. Importanţa infecţiilor persistente 485
21. FAMILII DE VIRUSURI CU SEMNIFICAŢIE CLINICĂ 487
21.1. Familia *Orthomyxoviridae* 487
21.2. Familia *Paramyxoviridae* 498
21.3. Familia *Rhabdoviridae* 507
21.4. Familia *Filoviridae* 513
21.5. Familia *Picornaviridae* 514
21.6. Arbovirusuri. Familia *Flaviviridae* 524

BCU CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

21.7. Familia *Asfarviridae* 534
21.8. Familia *Togaviridae* 535
21.9. Familia *Bunyaviridae* 538
21.10. Familia *Arenaviridae* 540
21.11. Familia *Coronaviridae* 543
21.12. Familia *Reoviridae* 546
21.13. Familia *Adenoviridae* 551
21.14. Familia *Herpesviridae* 558
21.15. Familia *Parvoviridae* 573
21.16. Familia *Poxviridae* 579
21.17. Familia *Hepadnaviridae* 584
21.18. Familia *Retraviridae* 593
21.19. *Mimivirus* 612
22. RĂSPUNSUL IMUN ANTIVIRAL 614
22.1. Mecanisme nespecifice (înnăscute) de protecție antivirală 614
22.1.1. Imunitatea nespecifică mediată celular 614
22.1.2. Interferonii și mecanismele acțiunii lor 615
22.2. Răspunsul imun antiviral specific (adaptativ) 622
22.2.1. Imunitatea mediată humoral 623
22.2.2. Protecția antivirală a mucoaselor 625
22.2.3. Imunitatea mediată celular 626
22.2.4. Mecanisme prin care virusurile evită efectorii răspunsului imun 628
22.2.4.1. Toleranța și/ sau diminuarea reactivității imunitare 629
22.2.3.2. Variația antigenică 630
23. NOȚIUNI GENERALE DE ONCOGENEZĂ 632
23.1. Agenții fizici și chimici ai malignizării 633
23.2. Etapele procesului de malignizare 634
23.3. Caracterele generale ale celulelor normale 635
23.4. Particularitățile funcționale ale celulelor maligne 637
23.5. Oncogenele celulare 641
23.6. Oncogeneza virală 644
23.7. Retravirusuri oncogene transductoare și netransductoare 646
23.6.1. Oncogenele virusurilor transductoare 646
23.6.2. Mecanismele oncogenezei cu retravirusuri 648
23.8. Dezoxiribovirusuri oncogene 651
23.8.1. Transformarea cu poliomavirusuri 653
23.8.2. Transformarea cu papilomavirusuri 656
23.8.3. Transformarea cu adenovirusuri 661
23.8.4. Transformarea cu herpesvirusuri 662
23.8.5. Transformarea cu virusul hepatitei B 663
24. AGENȚI INFECȚIOȘI SUBVIRALI 665
24.1. Virusul hepatitei D 665
24.1.1. Proteine codificate de virus 666
24.2. Viroizii 667
24.2.1. Patogenitatea viroizilor 669
24.3. Virusoizii 670
24.4. Virino 671
24.5. Prionii 671
24.5.1. Proteina neuronală PrP^c 672
24.5.2. Originea și apariția prionilor 673
24.5.3.Transmiterea experimentală a prionilor 675
24.5.4. Patogenitatea prionilor 675
25. VACCINURI VIRALE 678
25.1. Metode de atenuare a virulenței 678
25.2. Vaccinuri inactivate 679
25.3. Vaccinuri subunitare 680
25.3.1. Tehnici moderne de obținere a vaccinurilor subunitare 680
26. METODE DE STUDIU ȘI DE DIAGNOSTIC VIRAL 684
26.1. Metode directe 684
26.1.1. Metode microscopice 684
26.1.2. Metode de cultivare a virusurilor 685

BCU "MIHAIL KOGĂLNICEANU" UNIVERSITY LIBRARY

26.2. Metode indirecte 687
26.2.1. Metode serologice 687
26.2.1.1. Evidențierea anticorpilor 687
26.2.1.2. Evidențierea antigenelor virale 689
26.2.2. Metode moleculare. Detectarea acizilor nucleici 690
26.3. Cuantificarea multiplicării virale 693
26.4. Purificarea şi identificarea virusurilor 693
26.5. Acțiunea factorilor fizici şi chimici asupra virusurilor 694
27. CHIMIOTERAPIA INFECȚIILOR VIRALE 696
27.1. Analogii nucleozidelor 697
27.2. Amine ciclice 701
27.3. Inhibitori ai sintezei proteinelor: β-thiosemicarbazone 701
27.4. Foscarnet 702
27.5. Chimioterapia infecției cu HIV 702
27.6. Imunoterapia 705
27.7. Rezistența virală la agenții chimioterapeutici 706

PARTEA A III-A. MICOLOGIE MEDICALĂ
28. NOȚIUNI INTRODUCTIVE DE MICOLOGIE 710
28.1. Caracterizarea generală a regnului Fungi 710
28.2. Tipuri de infecții fungice 714
28.3. Fungi patogeni la om 715
28.3.1. Dermatomicete 715
28.3.1.1. Agenți etiologici ai micozelor cutanate 715
Microsporum sp.
Trichophyton sp.
Epidermophyton sp.
28.3.1.2. Agenți etiologici ai micozelor subcutanate 724
Sporothrix schenckii
Madura sp.
Madurella sp.
Nattrassia mangiferae
Alternaria sp.
Bipolaris sp.
Exserohilum sp.
Cladophialophora carrionii
Fonsecaea sp.
Curvularia sp.
Exophiala sp.
Phialophora verrucosa
Scedosporium sp.
28.3.2. Agenți etiologici ai micozelor sistemice primare 725
Histoplasma capsulatum
Coccidioides immitis
Paracoccidioides brasiliensis
Blastomyces dermatitidis
28.3.3. Agenți etiologici ai micozelor oportuniste 728
Candida sp.
Cryptococcus neoformans
Pneumocystis jiroveci (*Pn. carinii*)
Aspergillus
Acremonium
Geotrichum candidum
Onychocola canadensisi
Scopulariopsis
Paecilomyces
Penicillium
Trichoderma viride
Zigomicoze (mucormicoze)
28.4. Terapia infecțiilor fungice 737
Prescurtări 745

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PARTEA A II-A

VIROLOGIE MEDICALĂ

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PARTEA A II-A. VIROLOGIE MEDICALĂ

17. NOŢIUNI INTRODUCTIVE

Studiul virusurilor este mai palpitant decât un safari.

Virusurile[*] *sunt agenţi infecţioşi de natură nucleoproteică, care se disting net de sistemele biologice prin caracteristici unice structurale, biochimice şi funcţionale. Particularitatea structurală constă în organizarea de tip* acelular, *iar cea funcţională rezidă în faptul că virusurile se exprimă ca entităţi genetice numai în interrelaţiile cu sistemele biologice. Caracterele structurale şi funcţionale unice reies indirect şi din faptul că virusurile nu sunt incluse în nici unul dintre sistemele de clasificare a lumii vii.*

[*] Etimologic, denumirea de "virus" vine de la cuvântul grecesc "ios", al cărui sens este "otravă de natură biologică". Prin latinizarea acestui cuvânt a derivat noţiunea de "virus'.

Ştiinţa care se ocupă de studiul virusurilor se numeşte *Virologie*.

Primele cunoştiinţe ştiinţifice referitoare la virusuri datează de mai bine de un secol, însă preocupările de ordin practic pentru tratarea sau prevenirea unor maladii virale, datorită caracterului lor evident şi uneori foarte grav, sunt cunoscute din cele mai vechi timpuri. Incă din anii 2500 î. C., în China existau descrieri ale variolei umane, care se refereau atât la simptomatologia, cât şi la caracterul transmisibil al acestei maladii. Aristotel (484–322) afirma că rabia (turbarea) este transmisă prin muşcătura de câine.

Preocupările cu caracter strict aplicativ au devansat cu mult timp descoperirea propriu-zisă şi definirea pe plan conceptual a noţiunii de virus. Recunoscând că supravieţuitorii epidemiilor de variolă erau protejaţi de infecţiile ulterioare, chinezii au recurs la un procedeu empiric de vaccinare, prin inhalarea crustelor uscate din leziunile de variolă (variolizare). Variolizarea s-a practicat timp de secole, ca o metodă riscantă de prevenire a variolei. În 1796, Edward Jenner, după ce a suferit o infecţie variolică gravă la vârsta de 7 ani, ulterior, ca medic, a introdus vaccinarea v*ariolică*, sesizând că mulgătorii de vaci, care se infectează cu virusul *cowpox*, devin rezistenţi la infecţia cu virusul *variolei* (smallpox). L. Pasteur (1822–1895) a fundamentat ştiinţific practica producerii şi utilizării *vaccinului rabic*, fără să evidenţieze agentul infecţios. El presupunea că maladia este rezultatul infecţiei animalelor şi omului sănătos, cu un agent de dimensiuni foarte mici, cu particularităţi distincte, invizibil cu mijloacele optice ale timpului său şi care nu poate fi izolat prin metodele aplicabile altor agenţi patogeni.

În 1892, D. I. Ivanovski a arătat că *mozaicul tutunului*, ce se manifestă prin necroza unor zone ale frunzelor, este datorată unui agent transmisibil, invizibil la microscop şi care străbate filtrele ce reţin celulele bacteriene. Leziunile caracteristice sunt transmise în serie de la o plantă bolnavă, la cele sănătoase, prin filtratele de lichid acelular extras din frunzele infectate. In 1897, M. Beijerinck a confirmat filtrabilitatea acestui agent patogen, intuind natura sa deosebită şi l-a considerat ca fiind un agent "*contagium, vivum, fluidum*" (contagios, viu, fluid, adică trece prin filtrele care reţin bacteriile). A. Lwoff (1957) îl consideră pe Beijerinck ca fiind adevăratul *întemeietor al Virologiei* ca ştiinţă.

R. Dulbecco (1952) a cuantificat virusurile infecţioase pentru om şi animale, prin *testul plajelor de liză*. Preparatul viral diluat se foloseşte pentru a infecta monostratul celular, acoperit ulterior cu agar moale pentru a limita difuzia liberă a virionilor. Rezultatul este liza localizată a monostratului şi apariţia plajelor. Aceiaşi tehnică se foloseşte pentru izolarea virusurilor dintr-un amestec heterogen.

Capitolul de *virologie generală* îşi propune prezentarea particularităţilor moleculare ale structurii virionilor, diversitatea genetică şi modalităţile de expresie a genomului viral, precum şi mecanismele moleculare ale interacţiunii virus-celulă gazdă în diferitele sale variante: litică, persistentă sau oncogenă.

17.1. Modelul general de structură a virionului

Descrierile referitoare la anatomia virusurilor se referă totdeauna la *virion* – unitatea integrată de structură şi funcţie a tuturor virusurilor – dotată cu proprietatea de infecţiozitate a celulelor sensibile.

Din punct de vedere morfologic se disting următoarele tipuri de virioni (fig. 376):

1. Virioni de formă *sferică* (izodiametrică) sau sferoidală (de exemplu, virusurile gripale, adeno- şi herpesvirusurile, picorna şi reovirusurile etc.);
2. Virioni de formă *cilindrică* alungită, adică de bastonaş rigid sau flexibil (de exemplu, virusul mozaicului tutunului, fagii filamentoşi);
3. Virioni de formă *paralelipipedică,* caracteristică poxvirusurilor (de exemplu, virusul vaccinal, virusul variolei etc.);
4. Virioni cu formă de *obuz* sau de cartuş, la rhabdovirusuri;
5. Virioni în formă de *cireaşă cu coadă* (de exemplu, fagii cu coadă).

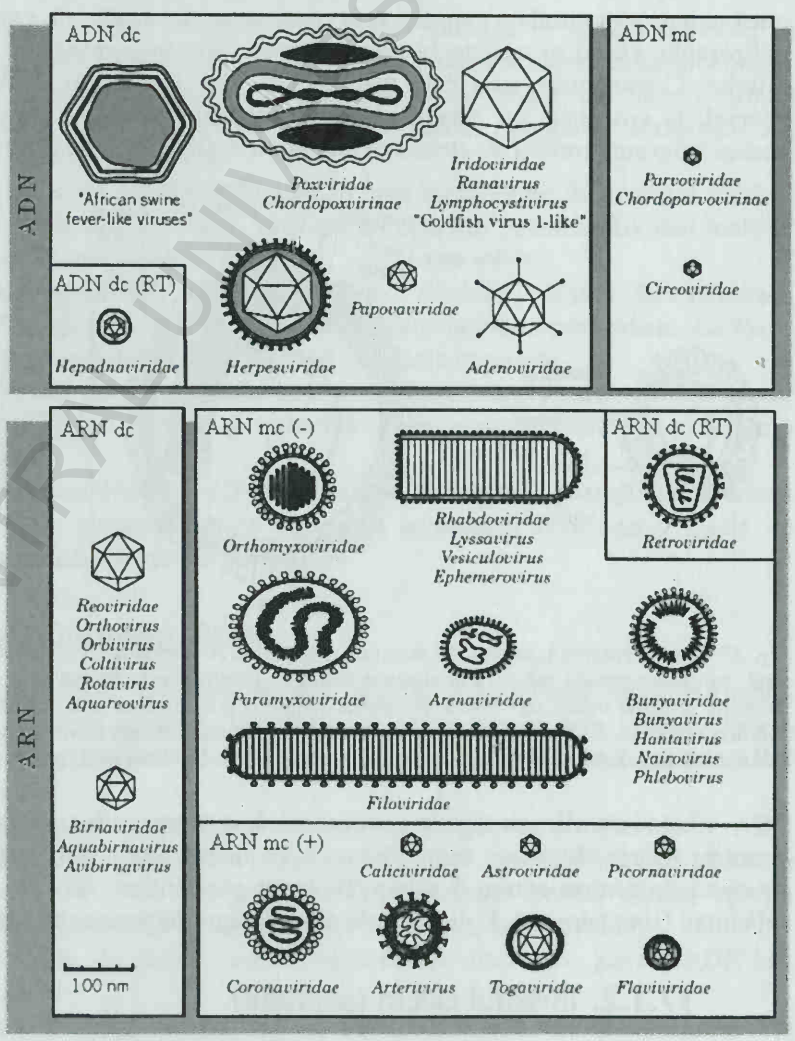


Fig. 376. Morfologia virionilor şi natura genomului familiilor de virusuri infecţioase pentru om şi animale (după Creighton, 1999).

Dimensiuni. Virusurile au dimensiuni submicroscopice. Cele mai mari sunt poxvirusurile, de 240–300 nm, adică apropiate de dimensiunile celor mai mici bacterii, la limita de rezoluţie a

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

microscopiei optice. Bacteriofagii cei mai mari ating 200 nm. Cele mai mici sunt enterovirusurile, sub 30 nm diam., adică de dimensiunile ribosomilor (diam. de 25–30 nm).

Tehnicile de centrifugare analitică au făcut posibilă obținerea unor cantități mari de virus purificat. Organizarea internă a virionului şi relațiile spațiale ale diferitelor componente structurale s-au evidențiat prin studii de difracție cu raze x a preparatelor virale în stare cristalină.

Virionii posedă doi constituienți structurali esențiali şi definitorii: *genomul* şi *capsida.* Virionii alcătuiți numai din genom şi capsidă, cărora le lipseşte învelişul extern, sunt caracteristici *virusurilor nude* (*Picorna-, Reo-, Adenovirus).* La virusurile *învelite*, celor două componente obligatorii se adaugă o structură de suprafață, denumită *peplos sau înveliş extern.* Peplosul poartă pe suprafața sa subunități proeminente (peplomere), denumite *spicule*, care sunt structuri supramoleculare de glicoproteine virale.

Majoritatea virusurilor au o morfologie specifică, conferită de modul de aşezare a capsomerelor în capsidă. Unele virusuri au o *capsidă helicală*, ce constă dintr-o înlănțuire a moleculelor proteice (capsomere), într-o catenă ce formează o spirală în jurul acidului nucleic. Alte virusuri au o *capsidă poliedrică.* Cel mai comun poliedru este *icozaedrul.*

Virusurile învelite au un aspect sferic, deşi capsida lor poate fi icozaedrică.

17.1.1. Capsida

Capsida este o structură proteică ce acoperă genomul viral (*capsa*, lb. greacă = cutie). Cea mai mică unitate structurală a capsidei este *capsomera.* La rândul ei, capsomera este alcătuită dintr-un lanț polipeptidic (fiind şi unitate biochimică) sau dintr-un agregat de catene polipeptidice identice sau diferite. Capsomerele sunt cele mai mici unități structurale vizibile la microscopul electronic. In general, la virusurile cu simetrie helicală, capsomerele sunt *unități morfologice* ale capsidei şi în acelaşi timp sunt *unități de structură biochimică*, fiind formate dintr-un singur polipeptid (fig. 377).

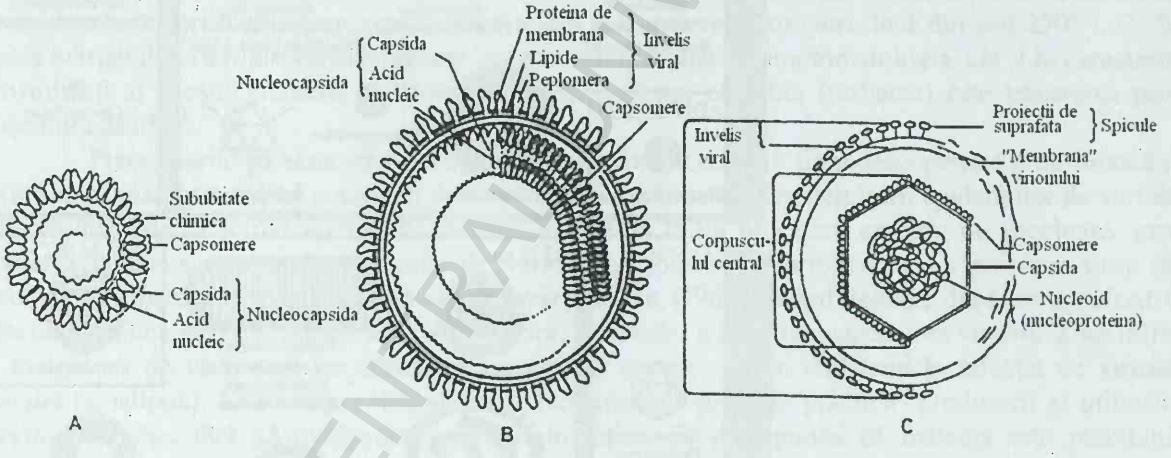


Fig. 377. Reprezentarea schematică a structurii virionului. A. Virion nud cu capsidă helicală. B. Virion acoperit de învelişul viral, cu nucleocapsidă tubulară şi simetrie helicală. Învelişul este format dintr-un dublu strat fosfolipidic, în care sunt inclavate proteine virale sub formă de spicule (peplomere). Învelişul este tapetat la interior de o proteină de membrană codificată de virus. C. Virion icozaedric format dintr-o regiune centrală (*core*) în care se găseşte genomul acoperit de capsida icozaedrică. Cele două componente formează nucleocapsida. Învelişul viral, prevăzut cu spicule, acoperă nucleocapsida.

La virusurile cu simetrie icozaedrică, capsomerele sunt numai unități morfologice, dar din punct de vedere biochimic sunt *oligomere.* In alcătuirea lor intră mai multe unități biochimice: cele cu structură de penton conțin 5 subunități (sunt pentamere), iar cele cu structură de hexon conțin trei subunitați (sunt trimere). Polipeptidele din structura oligomerului pot fi identice sau diferite.

17.1.2. Invelişul extern (peplosul)

Invelişul extern sau *peplosul* (*peplos*, lb. greacă = manta) este o structură accesorie care acoperă capsida unor virusuri. Peplosul este dobândit în timpul maturării virionilor prin procesul de *înmugurire* care, în general, are loc la suprafața celulei.

Peplosul viral întruneşte toate criteriile de structură trilaminară ale membranei celulei animale: stratul fosfolipidic dublu, în care sunt inclavate proteinele codificate de virus, dar şi proteine derivate din celulă. Fosfolipidele şi proteinele de origine celulară sunt diferite în funcţie de tipul de celulă în care a avut loc multiplicarea virală şi de sediul înmuguririi: prin membrana plasmatică (*Toga-, Rhabdo-, Para-, Orthomyxo, Retra-*), în reticulul endoplasmic (*Corona-, Flavi-*), în complexul Golgi (*Bunya-*). Virusurile herpetice se învelesc tranzitoriu pe membrana internă a nucleului, se dezvelesc la ieşirea din nucleu şi se reînvelesc în cisternele reticulului endoplasmic. Hepadnavirusurile au un înveliş de natură proteică, ce se asamblează la nivelul cisternelor de reticul endoplasmic.

Glicoproteinele codificate de virusuri sunt constituienţi universali ai peplosului, pe suprafaţa căruia proemină sub forma *spiculelor*. Diversitatea lor biochimică este foarte limitată (unul sau câteva tipuri pentru un virus). Glicoproteinele sunt formate dintr-un ax polipeptidic, la care se ataşează catenele laterale de *N-acetilglucozamină, manoză, fucoză, acid neuraminic*. Glicozilarea este catalizată de transferazele celulare, în timp ce proteina parcurge drumul de la locul sintezei, până la nivelul membranei. Greutatea lor moleculară este cuprinsă între 10 şi 100 kDa, iar conţinutul glucidic, între 5 şi 40%.

Glicoproteinele mediază interacţiunea virionului cu receptorii celulei sensibile şi favorizează fuziunea învelişului cu membrana celulei.

Glicoproteinele au rol important în procesul asamblării virale. Ele pot forma oligomeri şi interacţionează cu alte componente virale (capsida, proteina matriceală).

Unele virusuri învelite conţin proteine integrate, cu domenii multiple ce străbat peplosul, se oligo-merizează şi formează canale: proteina M_2 din învelişul virusului influenza formează canale ionice.

Retravirusurile încorporează neselectiv în înveliş, proteine membranare, dar alteori virusul recrutează selectiv proteine specifice celulei, care au rolul de a masca situsurile antigenice ale virionului şi de a evita astfel recunoaşterea imunitară.

Lipidele (sub forma glicolipidelor sau a fosfolipidelor) sunt încorporate în învelişul viral în timpul înmuguririi din membranele celulare. Învelişul viral are un conţinut semnificativ mai înalt de colesterol, comparativ cu membrana citoplasmatică.

Pentru majoritatea virusurilor învelite (*Herpes-, Toga-, Rhabdo-, Myxo, Retraviridae*), componentele moleculare ale învelişului sunt încorporate în membrane celulare preformate. La *Pox-, Iridovirus* şi lipofagi, învelişul viral se asamblează într-un mod mai puţin cunoscut.

Semnificaţia biologică a capsidei şi a învelişului extern. Capsida îndeplineşte un rol protector esenţial pentru genomul viral, acoperindu-l integral şi participă la procesele de adsorbţie şi fixare a virionului pe suprafaţa celulei sensibile.

Învelişul extern consolidează funcţiile capsidei, protejează nucleocapsida şi asigură o structură mai compactă a virionului. Spiculele proeminente pe suprafaţa peplosului favorizează fazele de adsorbţie şi fixare a virionului în procesul infecţios.

17.1.3. Genomul viral. Organizare fizică

Genomul viral este alcătuit dintr-o moleculă de acid nucleic – ADN sau ARN. Niciodată virionii nu conţin ambele tipuri de acizi nucleici. Virusurile al căror genom este alcătuit dintr-o moleculă de ADN aparţin grupului *dezoxiribovirusuri*, iar cele care au ca genom o moleculă de ARN formează grupul larg al *ribovirusurilor*.

Majoritatea virusurilor infecţioase pentru om şi animale au ca genom o moleculă de ARN monocatenar de polaritate *pozitivă* sau *negativă*. Numai membrii familiei *Reoviridae* au ca genom o moleculă de ARN dublu catenar. Peste 90% dintre virusurile infecţioase pentru plante, aparţin *ribovirusurilor*, genomul lor fiind alcătuit dintr-o moleculă ARN mono- sau dublu catenar.

Unele virusuri, în diferite stadii ale ciclului de multiplicare, au alternativ, genom ADN sau ARN (retra-, hepadna, caulimovirusuri).

Genomul viral poate avea o structură *unitară* sau informaţia genetică este distribuită în *mai multe segmente genomice* legate prin interacţiuni specifice.

Moleculele de acid nucleic viral pot fi *monocatenare* sau *dublu catenare, lineare* sau *circulare*. Faptul că genomul unor virusuri este format dintr-o singură catenă de ADN, s-a dedus din

observația că determinările cantitative ale *adeninei* nu sunt echivalente cu ale *timinei*, iar cantitatea de *guanină* nu este egală cu cea de *citozină*.

În funcție de structura moleculară a materialului genetic, virusurile cu genom ADN se împart în trei clase:

– virusuri cu genom dublu catenar, linear (adeno, herpes etc.);
– virusuri cu genom dublu catenar, circular (papova);
– virusuri cu genom monocatenar, linear (parvovirusuri).

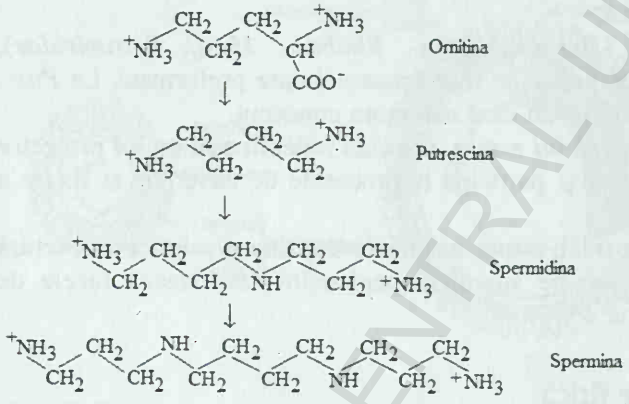
Toate moleculele genomice ADN lineare dublu catenare au secvențe repetate invers, numai la extremități (adeno-) sau, atât la extremități, cât și în interior.

Moleculele genomice *monocatenare*, lineare (parvovirusuri) sau circulare (fagul φx 174), au o tendință foarte accentuată de a se plia, formând bucle dublu catenare în ac de păr, ori de câte ori secvențele de baze permit formarea unui număr semnificativ de perechi, reunite prin intermediul punților de H. Circa jumătate din bazele de ADN monocatenar sunt legate prin punți de H, astfel încât molecula este foarte *compactă*. Odată cu formarea parțială a unei catene duble, molecula se pliază. Starea pliată este favorabilă unei împachetări optime, deoarece permite o stivuire mai eficientă a suprafețelor hidrofobe ale bazelor.

Genomul viral *dublu catenar*, din punct de vedere topologic (al configurației spațiale), poate fi *linear* cu extremități libere (adeno, herpes) sau cu *extremitățile legate covalent* prin punți fosfodiesterice (poxvirusuri), *circular închis* (papovavirusuri), cu diferite grade de supraspiralizare și corespunzător, cu un grad mai mare sau mai mic de condensare.

La fagul λ, genomul este dublu catenar linear, cu cozi monocatenare complementare adezive la cele două capete 5'(sticky ends).

Genomul viral are sarcină netă negativă (este polianionic) și este asociat cu două tipuri de molecule care favorizează plierea (condensarea) și împachetarea: *poliamine* (oligocationice) și *proteine (policationice)*. Dintre poliamine, spermina și spermidina s-au identificat în vironii mixo-, herpes-, adeno-, poxvirusurilor, iar la fagul T_4 – putrescina și spermidina.



Poliaminele. În prima treaptă a sintezei poliaminelor, din ornitină, ornitin-decarboxilaza (ODC) generează *putrescina*. Sinteza celorlalte poliamine este catalizată de S-adenozil-metionin-decarboxilază, spermidin-sintetază și respectiv spermin-sintetază. Poliaminele sunt ubicvitare în toate celulele, fiind necesare pentru creștere și diferențiere. Expresia crescută a ODC sau inducerea biosintezei sub acțiunea unor stimuli ai creșterii celulei eucariote, produce transformarea celulei. Inhibitorii ODC stopează creșterea celulară și sunt studiați pentru potențialul antineoplazic și ca agenți antimicrobieni.

Efectul de împachetare este favorizat de legăturile ionice între grupările *cationice* ale poliaminelor și proteinelor și de grupările *polianionice* ale acizilor nucleici.

Proteinele asociate genomului sunt *bazice* de tipul *protaminelor* și *histonelor* și sunt cunoscute sub denumirea generică de *nucleoproteine*. Unele proteine asociate genomului sunt ARN-polimeraze.

La unele virusuri ADN, la capătul 5' al fiecărei catene este asociată o *proteină*, care-i conferă stabilitate, dar are și rol în inițierea replicării genomului. Genomul viral și proteinele asociate formează *regiunea centrală*, electronodensă a virionului.

În mediul celular, după ce genomul viral este eliberat, poliaminele se disociază de ADN și cromosomul viral se relaxează, cu extinderea catenelor genomice, modificări conformaționale care favorizează procesele de replicare și transcriere în celula infectată.

Dimensiunile genomului ribovirusurilor sunt relativ uniforme, variațiile fiind în limita a 30 de ori: genomul *virusului hepatitei delta* are gr. mol. de 500 kDa (1678 nucleotide). Virusul hepatitei delta are cel mai mic genom și în ciclul multiplicării este dependent de virusul hepatitei B. Cel mai mare genom ARN este acela al *reovirusurilor* (15.000 kDa).

BCU "MF" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Genomul dezoxiribovirusurilor are o scară de variație dimensională mai largă, de la 1 la 185. Cele mai multe virusuri ADN au genom mic (cel mai mic genom este al *virusului hepatitei B* – 1000 kDa* = 3.200 nucleotide), dar unele virusuri au un genom asemănător cu al celulelor: fagi, phycodnavirus, mimivirus, poxvirus) infecțioase pentru bacterii, alge, nevertebrate și respectiv, vertebrate). *Mimivirus* are un genom de 1,2 megabaze ($1{,}2 \times 10^6$), mai mare decât al bacteriilor mici.

* Un Dalton este egal cu masa atomului de hidrogen, adică $1{,}672649 \times 10^{-24}$ g. 1 kDa =1 000 D.

Uneori, virionii unui preparat prezintă variații ale cantității de ARN genomic. De exemplu, la paramixovirusuri, un virion poate să conțină mai multe copii ale genomului viral. Alteori, particulele virale pot fi goale (lipsite de genom), sau includ numai un fragment genomic. Din genom lipsesc diferite secvențe genice, uneori chiar cele care condiționează multiplicarea virală. Aceștia sunt virioni defectivi și în ciclul multiplicării sunt dependenți de prezența în celulă, a unor virusuri "helper" (ajutătoare), care suplinesc defectele genetice ale virionilor defectivi.

17.1.4. Genomuri virale ARN segmentate (divizate, multipartite)

Unele ribovirusuri, infecțioase pentru organismul animal, precum și altele infecțioase pentru plante au genomul alcătuit din mai multe segmente. Ribovirusurile cu genom segmentat, infecțioase pentru om și animale (virusurile gripale, reo- și arenavirusurile) se caracterizează prin faptul că toate segmentele genomului sunt încorporate într-o capsidă comună.

Virusurile gripale au genomul alcătuit din 8 și respectiv 7 segmente de ARN monocatenar. La *Arenaviridae,* genomul este format din două segmente inegale (*L* = *L*arge = 2×10^6 D și *S* = *S*mall = 10^6 D). La reovirusuri, genomul are caracter de unicitate, fiind format din l0 segmente de ARN dublu catenare. La toate cele trei familii de virusuri, segmentele de ARN sunt *distincte*, adică se deosebesc prin secvența nucleotidelor și nu provin prin fragmentarea unei molecule mari. Dovada caracterului lor distinct este că moleculele nu hibridează unele cu altele, fiecare este transcrisă în ARNm specific și codifică sinteza unei proteine specifice.

Ribovirusurile cu genom segmentat, infecțioase pentru plante (*Tobra-, Bromo-, Como-, Nepo-, Cucumovirus*) au o particularitate distinctă: segmentele genomului lor nu sunt încorporate în aceiași capsidă virală, ci sunt distribuite individual în capside separate. Pentru desfășurarea ciclului de multiplicare virală este necesară infecția simultană cu toate particulele virale care constituie complementul genomic. Virusul mozaicului lucernei (alfalfavirus) are genomul alcătuit din 5 segmente, repartizate în 4 tipuri de virioni: trei au formă de bastonaș, fiecare având câte o moleculă de ARN, iar al IV-lea, de formă elipsoidală conține două segmente de ARN.

Avantajul genomului segmentat constă în aceea că mesajele genetice mai mici sunt mai ușor replicate și transmise în celula eucariotă animală sau vegetală. Pentru virusurile cu genom segmentat repartizat în mai multe capside, faptul pare dezavantajos pentru inițierea multiplicării, dependentă de toate segmentele genomice încapsidate separat, dar în realitate, în procesul infecțios se eliberează cantități imense de particule virale, care asigură șansa transmiterii tuturor particulelor ce conțin un complement genomic.

17.1.5. Modalități particulare de codificare a informației genetice la virusuri

Virusurile prezintă o diversitate proprie de *sisteme genetice*, neîntâlnită la sistemele celulare bacterii, fungi plante și animale, luate la un loc). Diversitatea genetică a virusurilor este consecința succesului lor de a parazita toate grupele cunoscute de organisme.

Raportul dintre gr. mol. a genomului și a produsului de sinteză este de circa 10/l pentru genomul mono-catenar și 20/l pentru cel dublu-catenar. Valoarea foarte mică a acestui raport se datorează existenței unor mecanisme moleculare care permit utilizarea cu maximă eficiență a informației genetice conținută în genom.

Datorită dimensiunilor mici ale genomului lor, virusurile fac economie de informație genetică, utilizând mai multe *strategii de codificare*. Noțiunea de "strategie" semnifică modalitățile de organizare și funcționare a informației genetice care permit utilizarea informației genetice cu randament optim.

1. Virusurile codifică sinteza unei varietăți foarte limitate de proteine. Capsida este formată din molecule proteice de același tip, sau dintr-un număr mic de tipuri de proteine diferite, la care se adaugă alte câteva tipuri de proteine asociate genomului. Asociate peplosului, se găsește un număr restrâns de glicoproteine.

2. Pentru realizarea unor funcții proprii, unele virusuri utilizează molecule ce aparțin total sau parțial celulei gazdă: de exemplu, enzima de replicare (ARN-polimeraza) a fagului Q-β (un fag ARN) este alcătuită din 4 subunități polipeptidice, dintre care una este codificată de virus, iar celelalte trei aparțin celulei.

3. Unele polipeptide virale îndeplinesc funcții multiple, având atât rol *structural* (adică sunt proteine care intră în alcătuirea virionului), cât și rol *reglator*.

4. În ciclul de multiplicare, unele virusuri utilizează informația genetică a virusurilor *helper*, care suplinesc anumite deficiențe de multiplicare ale virusului defectiv. Virusurile defective nu se pot multiplica până la stadiul de virus matur, deoarece le lipsesc genele codificatoare ale proteinelor structurale sau genele reglatoare ale morfogenezei. De exemplu, adenovirusurile au funcția de helper pentru multiplicarea unor parvovirusuri (*A*deno-*A*ssociated-*V*iruses – *AAV*), iar virusul hepatitei B are rol helper pentru multiplicarea virusului δ.

5. Virusurile utilizează mai multe modalități de transmitere a informației genetice de la genom la proteine, prin intermediul ARNm. Ele depășesc condițiile restrictive ale cantității limitate de informație genetică, impusă de dimensiunile reduse ale capsidei, prin existența *genelor suprapuse*. Suprapunerea genică semnifică faptul că o secvență de ADN poate să codifice mai mult decât o proteină. Fenomenul suprapunerii se realizează pe două căi.

1) *Înnădirea aceloraşi secvențe codificatoare ale moleculei de ARNm în succesiuni diferite.* Virusurile infecțioase pentru organismele eucariote, au informație genetică *discontinuă*, așa cum este și a celulelor gazdă. Fenomenul de *înnădire* (splicing) a secvențelor informaționale neadiacente de acid nucleic s-a identificat inițial la adenovirusuri* (Berget, 1977), dar acum este recunoscut ca fiind universal și are loc fie în timpul sintezei ARNm sau, în genomul eucariot, ca rezultat al rearanjării genelor prin fenomene de transpoziție în timpul diferențierii celulare.

* În celulele infectate cu adenovirusuri, moleculele de ARN care hibridează cu ADN viral sunt heterogene ca dimensiuni: aceleași sonde de ADN hibridează cu molecule lungi și cu molecule scurte de ARN. S-a dedus astfel, că genomul viral este transcris în molecule lungi, clivate ulterior în fragmente mai mici și reunite în molecule de ARNm de lungimi diferite (clivare-joncțiune = sudare). S-a precizat pentru prima dată că gena este discontinuă: are fragmente necodificatoare care alternează cu cele codificatoare. Apoi s-a constatat că discontinuitatea este o caracteristică generală a genelor celulei eucariote.

Genele adenovirale introno-exonice sunt transcrise de ARN-pol II în precursori ARNm. Precursorii sunt supuși proceselor de prelucrare și maturare, în care secvențele intronice sunt eliminate și degradate. Clivajul are loc totdeauna la aceleași secvențe semnal, dar joncțiunea reunește un număr *variabil* de secvențe codificatoare și în *succesiune alternativă*, astfel încât o genă (E1A) codifică cel puțin 8 proteine diferite. Reacțiile de trans-esterificare și legare a exonilor sunt catalizate de ansambluri alcătuite din 5 particule *ribonucleoproteice nucleare mici* (snRNP) denumite *spliceosomi*. Fiecare snRNP constă dintr-o moleculă mică de ARN și proteine, unice sau comune diferitelor snRNP.

ARNm este rezultatul unui proces de prelucrare* a copiei primare (ARN premesager = ARNpm), ce constă în eliminarea intronilor și înnădirea exonilor. La virusuri, exonii sunt sudați în *succesiuni diferite* în molecula de ARNm, ceea ce diversifică gama proteinelor codificate de o secvență de ADN. Secvențele intronilor nu se găsesc în ARNm matur.

* În timpul transcrierii ARN pm nascent este împachetat cu proteinele și formează particule RNP, în care copia este prelucrată și cu care rămâne asociată până când este exportată în citoplasmă.

Proteinele care se asociază cu ARNpm nascent au rol dublu:

1. conferă protecție anti-degradativă;
2. este chiar aparatul de prelucrare a ARNpm.

Prelucrarea ARNpm este un proces complex care începe chiar în timpul transcrierii și constă într-o succesiune de evenimente: bonetare, clivarea-înnădirea exonilor, poliadenilarea capătului 3', ARN-editing și exportul din nucleu.

Bonetarea ARNm constă în adăugarea *7-metil-G* la capătul 5' și se face imediat după transcriere, fiind necesară pentru înnădire, exportul nuclear, stabilitate și traducere.

Eliminarea secvențelor genice necodificatoare se face pe 2 căi:

– intronii *nu sunt transcriși*, deoarece ARN-polimeraza sare de la un exon la altul și ignoră intronii;

– intronii sunt transcrişi şi rezultă o copie primară (ARN-premesager), care este *clivată* pentru eliminarea intronilor, iar exonii sunt înnădiţi. Secţionarea intronilor şi înnădirea exonilor este rezultatul acţiunii unui aparat enzimatic, denumit *spliceosom*, format din multe proteine grupate în *particule RNP nucleare heterogene* (hnRNP). Complexul spliceosom recunoaşte secvenţa de clivare GU-intron-AG exon ce delimitează intronul şi îl excizează din ARNpm. Excizia intronilor este strâns asociată în timp cu etapa *înnădirii* (splicing) exonilor.

Unele molecule de ARNm se înnădesc singure, pentru că moleculele de ARN au activitate *ribozimică* şi intronii se elimină fără intervenţia aparatului enzimatic al spliceosom-ului. Reacţia nu este pur enzimatică, deoarece ARN însuşi se modifică. Se consideră că o enzimă adevărată rămâne nemodificată la sfârşitul reacţiei.

Genele histonei sunt excepţia pentru că nu conţin introni şi ARNm nu necesită clivare şi înnădire.

Capătul 3' al ARN este *poli-adenilat*. Secvenţa de clivare şi inserţie a poli-A este localizată în regiunea 3' netradusă, ce urmează codonului stop al traducerii. Polimeraza adaugă secvenţa poli-A de 100–200 de resturi la capătul 3'. Proteinele specifice ce se asociază cu poli-A îi măresc stabilitatea şi uşurează exportul nuclear şi traducerea ARNm matur.

Exportul nucleo-citoplasmatic al ARNm necesită interacţiunea cu proteine chaperoni, dintre care unele conţin semnale de export. ARNt şi ARNr nu sunt bonetate şi exportul lor nu necesită interacţiunea cu proteine specifice.

În citoplasmă, capătul 5' bonetat este recunoscut de factorul de iniţiere IF-4E, ce recrutează alte proteine şi formează un complex funcţional ce se asociază cu subunitatea 40S. Ansamblul alunecă pe ARNm până la codonul de iniţiere, unde leagă subunitatea 60S şi este iniţiată traducerea.

Echipamentul enzimatic care catalizează prelucrarea ARNm prin clivare şi înnădire este localizat în nucleu şi în consecinţă, mecanismul înnădirii genice poate fi activ numai la virusurile care au o fază nucleară a ciclului de multiplicare (adeno, herpes, papova, influenza).

2) *Iniţierea traducerii mesajului la două sau chiar trei situsuri diferite.* Unele virusuri *schimbă cadrul de citire a informaţiei în timpul traducerii* (frame shifting), iniţiind sinteza proteică la noi situsuri de traducere a ARNm (open reading frames – ORF). Prin iniţierea traducerii mesajului la două sau chiar trei situsuri diferite, aceiaşi secvenţă de nucleotide este tradusă în două sau trei proteine distincte.

Ribosomii au capacitatea intrinsecă de a schimba cadrul de citire în timpul traducerii mesajului, pe care unele virusuri o exploatează pentru a diversifica setul de proteine pe care le sintetizează. S-a sugerat că subunitatea 40S a primului ribosom angajat în traducerea ARNm se fixează la ***primul codon de iniţiere*** a traducerii (**AUG**). Restul ribosomilor alunecă pe molecula de ARNm, până la următoarea tripletă de iniţiere AUG, de unde reîncepe traducerea mesajului. De exemplu, în timpul traducerii mesajului pentru proteina *gag* a virusului sarcomului Rous, 5% din ribosomi îşi schimbă cadrul de citire pentru a sintetiza proteina *gag-pol*. Secvenţe specifice ale ARNm viral favorizează alunecarea ribosomilor, astfel încât se sintetizează şi mici cantităţi de revers-transcriptază (RT).

Schimbarea cadrului de citire poate fi rezultatul 'ARN editing', proces ce semnifică modificări specifice ale secvenţei de nucleotide şi constă în inserţia sau deleţia unei baze.

În ciuda diversităţii strategiilor funcţionale ale genomului viral, universalitatea codului genetic nu este încălcată, deşi anumiţi codoni pot avea o frecvenţă superioară.

Gene neesenţiale. Calificativul de ''genă neesenţială'' a genomului viral este complicat de faptul că un produs genic poate fi esenţial în anumite condiţii de mediu celular şi nesemnificativ în altele. De exemplu, gena Tk de HSV 1 nu este esenţială pentru multiplicarea virusului în celule care cresc şi se divid cu o rată crescută, dar este esenţială pentru replicarea genomului în celulele care nu se divid (neuroni). Gena Tk permite ca timidina exogenă să fie încorporată în ADN. Dependenţa virusului de produsul genei proprii depinde de nivelul activităţii enzimei în celula gazdă.

Un alt exemplu al unei gene neesenţiale este cea care codifică glicoproteina E_3 (de la adenovirusuri). Gena poate fi inactivată prin mutaţie şi ciclul de multiplicare virală nu este influenţat. Virusul mutant, *in vivo*, este mai puţin virulent decât virusul de tip sălbatic, iar leziunile tisulare sunt diminuate.

Glicoproteina E_3 este activă la nivelul reticulului endoplasmic şi stopează transportul moleculelor CMH I pe suprafaţa celulei infectate, astfel încât celulele Tc nu răspund eficient faţă de celulele infectate cu virusul de tip sălbatic. Se formează mai mult virus progen, iar patologia tisulară este mai amplă.

BCU "VASILE GOLDIŞ" ARAD LIBRARY

17.1.6. Infecţiozitatea acizilor nucleici virali

Desfăşurarea ciclului de multiplicare virală nu este condiţionată de ansamblul integrat al componentelor structurale ale virionului, ci în esenţă, numai de genomul viral şi uneori, de proteinele de replicare asociate acestuia. Infecţiozitatea acizilor nucleici virali s-a demonstrat iniţial pentru ADN fagic şi ulterior pentru ARN al VMT. Dacă acidul nucleic genomic funcţionează ca ARNm, infecţiozitatea sa este o proprietate fără excepţie. ARN genomic cu polaritate negativă, în stare pură, nu este infecţios, deoarece este necesară transcrierea sa într-o copie de ARN complementar, cu rol de ARNm.

Infecţiozitatea acizilor nucleici virali nu mai este condiţionată de interacţiunea cu receptorii suprafeţei celulare. De aceea, spectrul celulelor infectate prin intermediul acizilor nucleici purificaţi creşte foarte mult, dar eficienţa procesului infecţios (numărul de molecule genomice infecţioase/celulă şi respectiv cantitatea de virus progen) diminuează semnificativ.

Importanţa geneticii virale. Studiile de genetică virală au adus o contribuţie de o valoare deosebită la definirea unor noţiuni fundamentale. Analiza modului în care este codificată şi transmisă informaţia genetică, la virusurile infecţioase pentru celula animală a dat o definiţie mai flexibilă noţiunii de *genă*, ca rezultat al descoperirii că aceiaşi secvenţă de ADN sau ARN poate să specifice (să codifice) mai mult decât un produs genic. Conceptul vechi, "o genă = o enzimă" a fost înlocuit cu definiţia mai corectă, "o genă poate să codifice mai multe polipeptide". Datorită suprapunerii genice, fenomen descoperit la virusuri, genomul nu mai poate fi considerat ca o succesiune lineară de unităţi codificatoare independente.

Descoperirea caracterului discontinuu al informaţiei genetice este de asemenea, rezultatul studiului genetic al virusurilor infecţioase pentru celula umană şi animală.

Una dintre marile contribuţii ale virologiei animale la dezvoltarea ştiinţelor biologice în general şi a biologiei moleculare în special, a fost descoperirea şi caracterizarea *enzimei revers-transcriptază* a retravirusurilor. Pentru prima dată a devenit evident că transferul informaţiei genetice în sistemele biologice nu se face exclusiv pe filiera ADN --- ARN --- proteine, ci în anumite situaţii, informaţia genetică poate fi transmisă în sensul ARN --- ADN --- ARN ---- proteine. A fost astfel completată *axioma centrală a biologiei moleculare*, care susţinea transmiterea unidirecţională a informaţiei genetice.

Pe de altă parte, enzima revers-transcriptază a devenit unul dintre instrumentele foarte importante ale biotehnologiilor bazate pe clonare şi secvenţiere. S-a lărgit cadrul de aplicare a metodologiei ingineriei genice. A devenit posibilă propagarea copiilor ADN ale genomului viral ARN, precum şi a copiilor ADN obţinute prin reverstranscrierea ARNm celular.

Informaţia genetică virală conţine determinanţi genetici care asigură desfăşurarea ciclului de multiplicare, în celula gazdă sensibilă: replicarea genomului, informaţia genetică necesară devierii metabolismului celulei gazdă, în sensul sintezei componentelor virale, genele pentru sinteza proteinelor structurale şi reglatoare, precum şi genele care asigură asamblarea şi eliberarea virionilor progeni din celula gazdă.

Genomul viral condiţionează patogenitatea şi virulenţa virală şi asigură potenţialul de variabilitate a virusurilor. Variabilitatea este o proprietate esenţială pentru propagarea virusurilor în natură. Astfel, spiculele de hemaglutinină ale virusului gripal prezintă o variaţie biochimică de la un sezon la altul, iar spiculele virusului imunodeficienţei umane (HIV), cu rolul de a fixa virionul pe receptorii membranari ai limfocitului TCD_4, au tendinţa spre o variaţie biochimică accentuată.

17.2. Definirea conceptului modern de virus

Noţiunea de virus a fost definită în cadrul conceptual actual de către A. Lwoff, pe baza stabilirii unor deosebiri distincte între "virus" şi "nevirus". Ca o consecinţă a unui mare număr de caractere discriminatorii faţă de sfera viului (care semnifică existenţa unor deosebiri absolute) pe care le posedă în comun, s-a conchis ca virusurile formează un grup particular de agenţi infecţioşi, reuniţi într-o categorie unică, distinctă de lumea vie, faţă de care asemănările şi afinităţile sunt minime, iar diferenţele şi deosebirile sunt fundamentale (tabelul 67).

Tabelul 67.

Caracterele discriminatorii dintre virusuri şi bacterii.

Caractere	*Virusuri*	*Bacterii*
Unitatea structurală	Virionul	Celula bacteriană
Stările posibile de existenţă	*Virionul* sau virusul infecţios matur (particula virală infecţioasă). *Virus vegetativ*, adică genomul viral liber în celula infectată, care poate fi replicat. *Provirus* = genomul viral integrat în cromosomul celulei gazdă.	*Celula* bacteriană (forma vegetativă), capabilă de diviziune. *Sporul* bacterian (forma facultativă de diferenţiere).
Structura internă	Genomul viral şi capsida, structuri esenţiale şi obligatorii, formează împreună *nucleocapsida*. *Învelişul extern (peplosul)*, cu spicule hemaglutinante este o structură caracteristică numai virusurilor învelite.	Relativ complexă (structuri esenţiale şi accesorii): perete celular, membrana plasmatică, citoplasmă, nucleoid, ribosomi, vacuole, incluzii, spor, aparat fotosintetic, capsulă, flageli, pili, fimbrii.
Simetria la nivel molecular	Constantă, de tip helical, icozaedric sau binară (mixtă).	Absentă
Acizi nucleici	ADN sau ARN, niciodată ambii, cu localizare exclusivă în genomul viral.	ADN, în cromosom şi plasmide. ARN, ca ARNm, ARNt şi ARNr, în citoplasmă.
Proteine	Fiecare gen de virus are un număr fix de molecule proteice de acelaşi tip (identice) sau aparţinând unui număr mic de tipuri diferite. Proteinele virale au rol structural (intră în alcătuirea capsidei) şi uneori au rol enzimatic (sunt proteine de replicare a genomului).	Număr mare de molecule, ce aparţin la 2–3.000 de tipuri diferite, cu rol structural şi funcţional.
Glucide	De regulă sunt absente. Se găsesc în peplosul viral sub forma glicoproteinelor şi sinteza lor este catalizată de glicozil-transferazele celulare.	Prezente în mod constant
Lipide	De regulă sunt absente. Se găsesc în peplos şi provin din membrana celulară la nivelul căreia are loc învelirea virionului.	Prezente constant
Echipamentul enzimatic de biosinteză şi de catabolism.	Absent. Uneori virionul conţine enzime cu rol de replicare sau enzime care favorizează pătrunderea virionului sau eliberarea sa din celulă. Lipsesc enzimele de biosinteză sau cele producătoare de energie.	Prezent constant
Capacitatea de sinteză a moleculelor cu potenţial energetic ridicat.	Absentă	Prezentă constant
Capacitatea de sinteză independentă a constituienţilor chimici.	Absentă	Prezentă
Capacitatea de creştere.	Absentă	Prezentă constant
Capacitatea de diviziune.	Absentă	Prezentă constant
Dependenţa de substratul viu pentru multiplicare.	Se multiplică exclusiv în substratul celular viu, pornind uneori numai de la genom, iar alteori de la genom şi de la enzimele de replicare.	Multiplicarea celor parazite este independentă de substratul viu, cu excepţia rickettsiilor, chlamidiilor, *Buchnera** şi *Bdellovibrio* şi porneşte totdeauna de la ansamblul integrat al constituienţilor celulari, chiar pentru cele dependente de substratul viu. Ele au degenerat până la punctul de a necesita energie furnizată de celula gazdă, dar se deosebesc de virusuri.
Utilizarea sistemelor structurale şi biochimice ale gazdei în cursul parazitismului intracelular: – sistemul enzimatic Lipmann** –ARNt – ribosomii	Totdeauna	Bacteriile parazite –niciodată.
Tipul de parazitism	Parazitism absolut	Cel mult obligat parazite
Tipul de organizare	Acelular	Celular.

* *Buchnera* trăieşte numai în interiorul celulei eucariote şi este transmisă pe verticală, iar *Chlamydia* are o fază extracelulară.

** Sistemul enzimatic Lipmann cuprinde enzimele care convertesc energia potenţială a moleculelor, în energie utilă; enzimele care catalizează sinteza proteică (cu participarea ribosomilor şi a ARNt); componentele catenei de respiraţie celulară.

Caracterele enumerate în tabel relevă câteva particularităţi structurale şi funcţionale cu totul speciale, proprii exclusiv virusurilor. Conceptul de virus, definit pe baza însumării unui număr mare de criterii discriminatorii faţă de celula bacteriană, reflectă o totală lipsă de concordanţă şi absenţa oricărei afinităţi structurale şi funcţionale între virusuri şi sistemul biologic în forma sa cea mai simplă – celula bacteriană.

17.3. Natura virusurilor

Virusurile sunt entităţi infecţioase complexe şi organizate, deoarece conţin două componente esenţiale: una *genetică* (acidul nucleic) şi una *proteică*. Uneori, proteinele nu sunt esenţiale pentru exprimarea proprietăţilor sistemului, pentru că acidul nucleic în stare pură este infecţios. Caracterul înalt organizat al virionului rezultă din faptul că relaţiile spaţiale dintre genom şi capsidă sunt definite şi constante şi derivă din simetria la nivel molecular.

POLIAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Virionii *nu au echipament enzimatic* propriu, producător de energie. Uneori, virionul conține *enzime de replicare* a genomului. Consecința este că virionul nu are metabolism, nu creşte şi nu se divide. Virusurile realizează complexe biologice numai în contextul procesului infecțios în celula sensibilă. In afara relațiilor cu celula gazdă, virionul matur este o *entitate inertă*. Deoarece nu au metabolism propriu, virusurile nu se multiplică, ci *sunt multiplicate* de celulă, pornind numai de la genomul viral şi nu de la ansamblul integrat al constituienților structurali. Infecția virală este rezultatul pătrunderii în celulă, a virionului sau numai a acidului nucleic viral. Pentru sinteza componentelor virale este utilizat aparatul structural şi enzimatic al celulei infectate (ribosomii şi enzimele catalizatoare). Instrucțiunile programului genetic viral sunt executate numai în celula vie.

Starea de dependență totală a multiplicării virale de substratul celular viu, corespunde relației de *parazitism absolut*, fundamental distinctă de cea a *parazitismului obligat*, caracteristic unor microorganisme patogene (*Treponema, Rickettsia, Chlamydia* etc.). Aceste bacterii preiau substanțele nutritive din celula gazdă, au propriul aparat de sinteză a macromoleculelor componente, îşi păstrează totdeauna integritatea structurală. Diviziunea lor are loc pornind de la ansamblul integrat al structurilor celulare.

În contrast, multiplicarea virală necesită, în esență, numai genomul viral, toate celelalte componente necesare multiplicării fiind de origine celulară.

În acord cu concepția veche, virusurile sunt organisme primitive – "*contagium, vivum, fluidum*" – aşa cum le-a definit Beijerinck (1897). Concepția a dăinuit datorită prezenței în structura virusurilor, a două componente definitorii pentru lumea vie – *acizii nucleici şi proteinele*. Dar proprietățile particulare ale sistemelor biologice nu sunt date de moleculele componente, ci de nivelurile superioare de integrare funcțională a componentelor structurale.

Dificultatea majoră a încadrării virusurilor în categoria sistemelor vii sau nevii, decurge din faptul că, în prezent, *nu există o definiție* unanim acceptată a vieții. Definițiile se reduc la o enumerare a proprietăților observabile ale unui organism, dar multe dintre proprietățile viului se întâlnesc şi la formele de organizare ale materiei neanimate. Szent-Gyorgyi consideră că viața este o calitate a unor sisteme fizice, o expresie a interacțiunilor dintre structurile care alcătuiesc sistemul, dar este greu de definit.

In sprijinul concepției apartenenței virusurilor la lumea vie, a fost invocat *procesul multiplicării* lor, considerat ca fiind analog multiplicării celulelor bacteriene. Studiile ulterioare de biologie moleculară, au evidențiat diferențierea netă, de fond, între multiplicarea virală şi multiplicarea bacteriană: virusurile se multiplică într-un substrat celular viu, pornind exclusiv de la *genomul viral*, după modelul furnizat de informația genetică înscrisă în genom.

Dintre marii virologi, foarte puțini susțin ca virusurile sunt vii. S. Luria (1973) le consideră vii, pornind de la un punct de vedere foarte original de a defini sistemele biologice: el consideră că un sistem biologic (care are calitatea de viu) este o entitate care, după ce a fost izolată, îşi păstrează o configurație specifică şi prin aceasta, posibilitatea de a fi reintegrată în circuitul materiei vii. Din acest punct de vedere, virusul este un organism într-o măsură mai mare chiar decât o celulă din organismul unui metazoar.

Viața reprezintă capacitatea de a reproduce un anumit tip de organizare specific şi independent: după Luria, o moleculă de ADN, *in vitro,* este vie, pentru că îşi păstrează conformația, are o structură şi o organizare proprie, un anumit grad de autonomie.

Cei mai mulți autori consideră că *încadrarea virusurilor în lumea vie este imposibilă, artificială sau forțată.*

În evoluție, *viul* începe numai după constituirea unui *program genetic*, dar proprietatea fundamentală a viului este *capacitatea de autoreproducere.*

Virusurile posedă anumite *proprietăți ale sistemelor vii*: au un program genetic, se disemineză, sunt sensibile la acțiunea factorilor de mediu, dar sunt *lipsite de autonomie,* adică de *capacitatea de a se manifesta ca sisteme biologice de sine stătătoare. Lipsa de autonomie le plasează în afara sferei viului.* Virusurile nu se reproduc ca sisteme autonome, ci sunt multiplicate numai de sistemele celulare.

Rich A. (1980) caracterizează sistemele vii, în funcție de fluxul diferitelor elemente şi procese pe care le desfăşoară. Sistemele biologice realizează un flux triplu: *de energie, de materie şi de informație*, care coordonează multitudinea reacțiilor chimice. Virusurile sunt sisteme informaționale. Prin programul genetic, virusurile interacționează cu sistemele vii, fac schimb de informație genetică, dar virionul matur în afara celulei este inert.

După F. Jacob (1970), distincția dintre viu și neviu, o constituie *raportul celor două categorii de sisteme cu timpul.*

Organismele sunt indisolubil legate de timpul istoric, în sensul că sunt rezultatul unui proces istoric evolutiv. Nici una dintre structurile lor nu poate fi detașată de contextul istoric. Virusurile au un *timp istoric* al evoluției proprii, legat intrinsec de gazdele celulare, conservă experiența trecutului și o transmit, întocmai ca și ființele vii. Probabil că la origini au întrunit mai multe caracteristici ale viului, pe care le-au pierdut de-a lungul evoluției. Corpurile nevii nu depind de timpul istoric.

După Crick (1966), un sistem biologic trebuie să îndeplinească trei condiții minimale: 1) să aibă capacitatea de *creștere*; 2) să aibă *metabolism* (să facă sinteze moleculare și să producă energie); 3) să se autoreproducă. El consideră că încadrarea virusurilor în sistemele vii, înseamnă a extinde proprietățile lor dincolo de anumite limite. Virusul în afara relației sale cu substratul celular nu este viu, dar sistemul virus-celulă are toate proprietățile sistemului biologic.

Monod (1971) consideră că sistemele biologice sunt singurele din univers, dotate cu următoarele patru proprietăți definitorii esențiale: 1) *morfogeneza autonomă* (proprietatea de a se construi ele înșile); 2) *emergența* (proprietatea de reproducere); 3) *reproducerea* la nivel molecular, cu caracter predominant nevarietar; 4) *teleonomia* (proprietatea de a avea o structură și o organizare adaptate supraviețuirii individului și speciei). Virusurile nu îndeplinesc aceste criterii.

Pentru A. Lwoff (1981), organismul viu este un sistem ordonat și integrat, de structuri și funcții interdependente, capabil de metabolism, creștere și reproducere. Ceea ce determină complexitatea unui organism superior organizat, în raport cu un virus nu este complexitatea superioară a moleculelor sale, ci gradul mai înalt de organizare și integrare a acestor molecule.

Insumând aceste criterii, uneori complementare, prin care sunt definite sistemele biologice, concluzia este că unitatea fundamentală (ce răspunde acestor criterii), care stă la baza organizării tuturor sistemelor biologice este *celula.*

Dintre toate celulele cunoscute, bacteria reprezintă cea mai simplă unitate de integrare și reproducere, care reunește calitățile de organizare, autonomie și invarianță, prin care se caracterizează sistemele vii. Celula bacteriană constituie *un minim vital,* situată la frontiera lumii vii. Nivelul inferior celulei bacteriene se definește în termeni de chimie și de fizică, iar sistemele superioare, în termeni de organizare (F. Jacob, 1970).

"Pentru că virusurile nu sunt nici organisme, nici celule, ele nu sunt ființe vii. Virusurile sunt virusuri pentru ca virusurile sunt virusuri" (A. Lwoff. 1962, 1981).

17.4. Simetria virusurilor

Simetria este definită de aranjarea ordonată și repetată într-un ansamblu, a subunităților sale identice ca formă și mărime, dispuse în jurul unui plan sau al unui ax.

Mult timp după descoperirea virusurilor și după acceptarea naturii lor nucleoproteice s-a considerat ca genomul este acoperit de o moleculă proteică uriașă. Intr-o capsidă de dimensiuni medii, intră circa 330 000 de aminoacizi. Dacă fiecare aminoacid este codificat de trei baze, pentru edificarea structurii capsidei ar fi necesar un genom care să cuprindă circa un milion de nucleotide. Dar numai cele mai mari virusuri (Mimivirus) au un genom de asemenea dimensiuni. În cursul sintezei unei molecule proteice atât de mari, ar crește mult șansa încorporării greșite a aminoacizilor, astfel încât moleculele proteice ar fi inutilizabile pentru morfogeneza virală. Ineficiența asamblării ar fi un dezavantaj incompatibil cu perpetuarea virusurilor în natură.

Watson și Crick (1956) au adus dovada că genomul viral, datorită dimensiunilor sale reduse nu poate codifica sinteza unei molecule mari* și nici sinteza unui număr mare de proteine diferite. Ei au presupus că în alcătuirea capsidei intră un număr mare de *molecule identice, dispuse după o arhitectură riguros simetrică.* Ipoteza a fost verificată prin metode biochimice, de analiză a gr. mol. a proteinelor capsidale și a compoziției lor în aminoacizi.

* Avantajele folosirii subunităților mici pentru a construi structuri complexe sunt multiple:
1. reduce cantitatea de informație genetică necesară;
2. asamblarea și dezasamblarea pot fi ușor controlate, deoarece subunitățile se asociază prin legături multiple cu nivel energetic scăzut;
3. erorile în sinteza structurii sunt mai ușor evitate, deoarece mecanismele de corecție pot opera în cursul asamblării pentru a exclude subunitățile malformate.

În natură există exemple de structuri cu *simetrie moleculară*: toate cristalele au moleculele componente aşezate simetric. Ele au inspirat pe autorii modelului aşezării simetrice a moleculelor capsidei virale.

În structura moleculară a capsidei intră un număr fix de molecule proteice de acelaşi tip, sau un număr limitat de tipuri diferite, dispuse obligatoriu într-o aranjare simetrică. Ca şi în structura cristalelor, ele au o aranjare perfect ordonată.

Watson şi Crick au dedus că dintre toate tipurile de simetrie cunoscute, numai simetria helicală şi cea cubică, permit împachetarea ordonată a subunităților componente, realizând simultan şi condiția obligatorie a identității ambianței lor chimice. La baza simetriei moleculare a cristalografiei geometrice stă *principiul echivalenței.* Conform acestui principiu, oricare dintre componentele unei structuri cu organizare simetrică, trebuie să se afle în ambianța unor componente echivalente. Deoarece elementele de construcție ale capsidei virale (capsomerele), uneori nu sunt perfect identice (unele sunt trimere, altele sunt pentamere), iar pe altă parte, moleculele mari sunt uşor deformabile, principiul echivalenței este încălcat şi se aplică principiul *cvasiechivalenței.*

S-au descris trei tipuri de simetrie virală:

1. *simetria helicală* (la virusul mozaicului tutunului, la mixo-, paramixo-, rhabdovirusuri etc.);
2. *simetria icozaedrică* (la polio-, adeno-, herpesvirusuri);
3. *simetria mixtă*, la fagii din seria T par (capul are simetrie icozaedrică, iar coada are simetrie helicală).

17.4.1. Simetria helicală

Simetria helicală este definită de aşezarea unităților componente în jurul unui ax, care este supus, concomitent, unei mişcări de *rotație* şi unei mişcări de *translație*, paralelă cu acelaşi ax (mişcarea este similară unui şurub). Capsomerele sunt aşezate în mod repetat, având poziții rezultate din cele două tipuri de mişcare simultană în jurul axului şi paralelă cu acesta, astfel încât definesc o suprafață cilindrică, cu o structură helicală.

Unele virusuri au nucleocapside helicale *flexibile*, ceea ce le permite să dobândească o formă sferică (izodiametrică, după ce sunt învelite de peplos, sau o formă lineară flexuoasă, dacă sunt nude (de exemplu, unii bacteriofagi). Cele cu nucleocapsidă *rigidă* au formă cilindrică.

Dintre virusurile cu simetrie helicală, cu nucleocapsidă rigidă, cel mai cunoscut este VMT. Diametrul extern al cilindrului este de 18 nm, iar cel intern, de 4 nm. Lungimea cilindrului este de 300 nm. Capsida este alcătuită din 2130 capsomere identice, formate la rândul lor dintr-o singură unitate proteică (capsomere monomere), cu gr. mol. de 17,5 kDa, fiecare proteină având 158 aminoacizi, a căror secvență este cunoscută. Genomul său este o moleculă de ARN monocatenar, lineară, cu gr. mol. de 2 x 10^6 D, aşezat în zona centrală a virionului, inclavat între capsomere. Configurația spațială a genomului este o spirală cu diametrul de 8 nm (mai mare decât diametrul intern al cilindrului). Din această cauză, spirele de ARN genomic se inclavează şi se inseră printre moleculele proteice capsidale, deoarece acestea sunt deformabile, nefiind corpuri geometrice perfecte. Fiecare capsomeră are raporturi spațiale cu trei nucleotide. Fiecare tur de helice a ARN conține 49 de nucleotide, care se găsesc în raporturi spațiale cu 16,3 molecule proteice, aşezate helical.

Unele virusuri nude, cu simetrie helicală au aspectul unor filamente flexibile şi o structură tubulară mai laxă (fagii filamentoşi). O serie de virusuri infecțioase pentru om şi animale prezintă o nucleocapsidă cu un grad foarte accentuat de flexibilitate, astfel încât virionul ia forma sferică. Faptul se explică prin flexibilitatea individuală a fiecărei capsomere, evidențiată la paramixovirusuri. Cele mai reprezentative virusuri cu capsidă helicală flexibilă aparțin familiilor *Orthomyxo, Paramyxo-* şi *Rhabdoviridae.*

17.4.2. Simetria icozaedrică

Virusurile cu simetrie icozaedrică au fost considerate ca având o formă sferică (izodiametrică), deoarece pe imaginile electrono-optice, la o mărime moderată, aspectul lor este sferic. In realitate,

BCU "IOAN SLAVICI" UNIVERSITY LIBRARY

aceste virusuri au un contur hexagonal, datorită capsidei lor poliedrice, cu un înalt grad de organizare, constituită din capsomere aşezate după o simetrie riguroasă.

Virionii cu simetrie icozaedrică, în aparenţă de formă sferică, sunt constituiţi din capsomere asimetrice (neidentice), aşezate în jurul axelor de simetrie.

Spre deosebire de VMT, la care unitatea proteică este în acelaşi timp şi unitate de structură, la virusurile cu simetrie icozaedrică, unităţile morfologice vizibile la microscopul electronic (capsomerele) sunt alcătuite din câteva (3–5) subunităţi proteice. Ca urmare, ambianţa fiecărei subunităţi şi legăturile cu vecinele sale nu sunt perfect identice, ci aproximativ echivalente sau *cvasiechivalente* (Caspar şi Klug, 1962).

Conturul hexagonal foarte regulat al virusurilor sferice, aşa cum apare la microscopul electronic la măriri înalte sugerează ideia că forma lor ar fi apropiată de aceea a unui corp solid cu toate feţele identice, cu toate laturile şi unghiurile egale. Din cele 5 corpuri solide euclidiene care răspund acestor condiţii şi anume, *tetraedrul, cubul, octaedrul, dodecaedrul* şi *icozaedrul*, ultimul dă un profil hexagonal al umbrei sale, în cele mai multe orientări ale fasciculului de lumină.

Simetria icozaedrică a virusurilor "sferice" a fost clarificată după mai multe experienţe şi demonstraţii intuitive. In microscopia electronică s-a utilizat pe scară largă, tehnica de umbrire a preparatului viral, adică acoperirea sa cu un strat monoatomic de metal (aur) pulverizat. Astfel, dimensiunile particulelor virale se măresc artificial. Metalizarea măreşte densitatea virionilor la fluxul de electroni şi evidenţierea lor este mai uşoară. Williams şi Smith (1958) au demonstrat că umbrele proiectate de un icozaedru pe o suprafaţă plană pe care este aşezat şi iluminat din diferite unghiuri corespund exact imaginii electrono-optice a virusului *Tipula iridescent* (patogen pentru larvele de insecte) umbrit prin metalizare. Expuse la fluxul de electroni, particulele virale icozaedrice, umbrite, nu dau o umbră sferică, ci o umbră care sugerează organizarea lor poligonală. Forma umbrei este diferită în funcţie de incidenţa fasciculului de electroni, dar totdeauna sugerează a fi dată de un poligon cu toate feţele identice, cu toate laturile şi unghiurile egale. Dintre cele 5 solide analizate, iluminate în aceleaşi condiţii sub diferite unghiuri de incidenţă, umbra dată de virionii umbriţi prin metalizare se aseamănă cel mai mult cu umbra rezultată după iluminarea laterală a *icozaedrului*. Icozaedrul este un poliedru regulat cu 20 de feţe, toate triunghiuri echilaterale (*eicosi*, lb. greacă = 20), 30 de muchii (creste) şi 12 vârfuri (vertexuri). El are cel mai înalt tip de simetrie, caracterizat ca fiind de tip 5: 3 :2, deoarece are 6 axe de simetrie rotaţională de ordinul 5, 10 axe de simetrie de ordinul 3 şi 15 axe de simetrie de ordinul 2.

Virusurile "sferice" prezintă şi ele o simetrie de ordinul 5: 3: 2, deoarece capsomerele sunt aşezate pe /sau în jurul axelor de simetrie de tip 5: 3: 2 ale unui icozaedru. In natură există exemple similare. De exemplu, simetria de ordinul 5 este cea mai frecventă la flori. Trepiedul unui aparat fotografic are un ax de simetrie de tip 3. O scară în formă de spirală prezintă o simetrie rotaţională de tip 2 în jurul axului sau central.

17.4.3. Probleme legate de modul de construcţie a virionilor icozaedrici

Descoperirea simetriei icozaedrice a virionilor "sferici" ridică o serie de probleme privind modul în care poate fi construită o astfel de structură. In acest sens s-au elaborat o serie de ipoteze, fără ca până astăzi să se fi ajuns la o concepţie unitară.

Microscopia electronică a demonstrat în cazul virusurilor din această categorie, existenţa a două tipuri de capsomere, având 5 şi respectiv 6 laturi (pentoni şi hexoni), rezultând la rândul lor, din aranjarea smetrică a unor unităţi de construcţie mai mici. Problema construcţiei particulei virale constă în a identifica modul în care capsomerele de formă penta- şi hexagonală se pot aranja simetric pentru a acoperi o suprafaţă închisă, alcătuind un fel de cutie icozaedrică.

Încercând să explice această construcţie, Caspar şi Klug (1962) au recurs la unul din principiile de geometrie aplicată de arhitectul B. Fuller în construcţia domului geodezic. In proiectul de plan (realizat în construcţie) pentru cupola domului, Fuller a divizat suprafaţa unei sfere în faţete triunghiulare echilaterale, în raporturi cvasiechivalente, aranjate după o simetrie icozaedrică. Procedeul triangulării sferei oferă soluţia optimă pentru asamblarea unei cutii închise, construită din unităţi identice de structură. Un grad comparabil de cvasiechivalenţe nu poate fi realizat prin nici un alt model de subdivizare a suprafeţei unei sfere, deoarece creează tensiuni net superioare.

Unitățile moleculare identice ale capsidei, în acord cu ipoteza lui Caspar şi Klug (1962) se leagă specific şi formează o structură stabilă şi simetrică, deoarece există un număr limitat de căi în care o anumită unitate poate fi legată de vecinele sale pentru a forma un număr maxim de legături stabile. Cea mai simplă situație este aceea întâlnită la cristale, care apar ca o rețea periodic tridimensională, în care, fiecare unitate este în raporturi echivalente cu vecinele sale. In cazul particulelor virale, moleculele capsidale, deşi identice, nu sunt în raporturi exact echivalente, ci numai *cvasiechivalente*. Aşezarea subunităților de construcție în raporturi cvasiechivalente face posibilă asamblarea unui număr redus de subunități mai mari într-o capsidă puțin mai deformată, dar păstrând simetria icozaedrică.

Pentru a închide icozaedrul, sunt necesare două tipuri de unități de construcție: pentagonale şi hexagonale. Cele hexagonale sunt aşezate pe fețele şi pe muchiile icozaedrului, iar cele pentagonale, la vârfurile icozaedrului. Radiolarul *Aulonia hexagona* (descris de Haeckel) are scheletul calcaros, alcătuit din unități de formă hexa- şi pentagonală şi probabil a inspirat pe autorii acestui model de simetrie.

Relațiile dintre genom şi capsidă, la virusurile icozaedrice sunt greu de explicat. In unele cazuri, genomul viral în asociație cu una sau cu mai multe proteine bazice, formează regiunea centrală ("core") a nucleocapsidei cvasisferice. Alteori (la herpesvirusuri), genomul ADN este răsucit pe o structură formată din proteine fibrilare, rezultând o structură toroidală. La adenovirusuri, genomul are interacțiuni ferme cu proteinele capsidale, cea ce conferă stabilitate maximă structurii nucleocapsidice.

Cele mai importante familii de virusuri cu simetrie icozaedrică, din punct de vedere practic (clinic) şi teoretic sunt picorna-, adeno- şi herpesvirusurile.

Simetria icozaedrică prezintă avantaje funcționale importante, evidențiate prin eficiența multiplicării virale. Capsida icozaedrică oferă un volum mai mare pentru moleculele componente şi poate fi asamblată cu o mai mare economie de proteine, deoarece oferă posibilitatea împachetării mai compacte a genomului, comparativ cu cele helicale. De exemplu, genomul ARN al virusului mozaicului galben al napului este acoperit de 180 de molecule proteice, dispuse după o simetrie icozaedrică, în timp ce genomul VMT, de dimensiuni echivalente este acoperit de o capsidă alcătuită din 2130 capsomere. Alte avantaje sunt legate de uşurința asamblării particulei virale şi mai ales de stabilitatea structurii care rezultă.

17.4.4. Simetria binară

Simetria complexă sau binară este prezentă în modul cel mai evident la bacteriofagii cu coadă contractilă (de exemplu, fagii din seria T-par, care infectează *E. coli*), a caror structură formează un adevărat dispozitiv pentru injectarea ADN în celula bacteriană: capul are o simetrie *icozaedrică*, în timp ce capsomerele cozii sunt ordonate după o simetrie *helicală*.

Bibliografie

Holland J. J. 1990. Defective Viral Genomes, în vol. Virology, Sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Lemke P. A. 1976. Viruses of Eucariotic Microorganisms – Annu. Rev. Microbiol. 36: 105–145.

Navaratnarajah C. K., Warrier R., Kuhn R. K. 2008. Assembly of Viruses: Enveloped Particles, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Zarnea G. 1984. Tratat de Microbiologie generală, vol. I, Ed. Academiei RSR.

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

18. MULTIPLICAREA VIRUSURILOR

Virusurile sunt studiate nu numai pentru patologia pe care o determină la gazdele lor, ci şi ca sisteme model pentru studiul proceselor moleculare şi ca instrumente pentru identificarea unor căi de reglare. Studiile de virologie au dus la înţelegerea reglării genice pozitive şi negative, a interacţiunilor represor-operator, a replicării ADN, a alungirii şi terminării transcrierii, a semnalării imunitare, a înnădirii ARN, a transformării oncogene.

Multe virusuri se multiplică în culturi de celule sau în oul embrionat, în condiţii strict controlate. Inocularea organismului animal este încă folosită pentru izolarea primară a anumitor virusuri şi pentru studiile de patogeneză şi oncogeneză virală. Laboratoarele de diagnostic cultivă virusurile cu scopul de a le izola din probele clinice pentru a stabili cauza procesului patologic, iar laboratoarele de cercetare le cultivă pentru analiza expresiei genelor virale.

Multiplicarea este procesul complex în cursul căruia are loc transcrierea şi traducerea informaţiei genetice în proteine, replicarea genomului şi asamblarea virionilor progeni.

Procesul multiplicării virale prezintă particularităţi care decurg din *parazitismul absolut*, de nivel genetic, al acestor entităţi. Multiplicarea are loc exclusiv în celulele vii, care furnizează nu numai monomerii precursori ai macromoleculelor, ci şi întregul dispozitiv celular efector (ribosomi, enzime activatoare ale aminoacizilor, ARNt, diferiţi factori solubili, sistemele generatoare de energie etc.).

Celula infectată cu un virus constituie un complex viu – *complexul virus-celulă* – în care se desfăşoară două categorii de procese:

- *sintezele moleculare* specific virale;
- *diataxia* virală. Termenul de 'diataxie' (Lwoff, 1981) semnifică 'punerea în ordine' sau asamblarea moleculelor virale, în structuri specifice.

Multiplicarea virală este, în esenţă, rezultatul exprimării programului genetic viral, datorită căruia, ordinea celulară normală este înlocuită de ordinea virală. Informaţia genetică virală deviază metabolismul celulei.

Deşi celula poate asigura majoritatea funcţiilor multiplicării virale, adeseori este necesară acţiunea unor enzime virale cu rol de replicaze, existente în virion sau codificate timpuriu de genomul viral.

Numărul genelor virale diferă considerabil. Ele codifică sinteza următoarelor categorii de proteine:

- enzime pentru *replicarea genomului* viral (replicaze). Ele pot fi componente ale virionului infecţios sau se sintetizează în celulă, după infecţie;
- proteine *structurale*, componente ale capsidei şi peplosului;
- proteine *reglatoare*, de două categorii: a) cele care modifică specificitatea aparatului de biosinteză al celulei în sensul specificităţii virale; b) proteine reglatoare ale morfogenezei virale.

Multiplicarea virală (producerea particulelor virale progene) este condiţionată de infecţia fiecărei celule, *in vivo* sau *in vitro*, cu cel puţin o particulă virală. Practic însă, pentru a asigura infecţia fiecărei celule a unei culturi şi un grad foarte înalt de sincronizare a etapelor multiplicării sunt necesare 10–100 particule virale pentru fiecare celulă.

Calitatea unei celule sau a unui organism de a fi gazdă pentru multiplicarea unui virus poartă denumirea de *sensibilitate*.

Pentru ca o celulă să fie sensibilă la infecţie sunt necesare două condiţii:

- virionul să se fixeze stabil de componente moleculare ale suprafeţei celulei;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

– celula să permită desfăşurarea ciclului de multiplicare (să fie permisivă). Particularităţile funcţionale ale celulelor care condiţionează desfăşurarea ciclului de multiplicare virală, au fost echivalate, prin analogie, cu factorii de creştere ai celulei bacteriene şi s-au denumit factori de multiplicare.

Tipurile de celule şi speciile de organisme pe care le poate infecta şi în care se poate multiplica un virus, definesc *spectrul său de gazdă*. Unele virusuri au spectrul de gazdă foarte larg şi se pot multiplica în celulele unor specii foarte diverse. De exemplu, arbovirusurile se multiplică în ţesuturile insectelor hematofage şi sunt transmise vertebratelor, la care produc infecţii. Unele rhabdovirusuri infecţioase pentru vertebrate se multiplică în ţesuturile insectelor, dar şi ale unor plante. Alte virusuri sunt foarte specializate şi infectează câteva tipuri de celule ale unei specii.

Multiplicarea virală se desfăşoară într-o serie de etape succesive, mai mult sau mai puţin secvenţiale, deşi o anumită fază se continuă în faza următoare, astfel încât după câteva ore de la infecţie, într-o singură celulă se pot întâlni majoritatea fazelor multiplicării unui virus cu genom ADN. Multiplicarea virală propriu-zisă este precedată de interacţiunea virionilor cu substratul celular.

18.1. Iniţierea procesului infecţios

Evenimentul preliminar al multiplicării este *adsorbţia* particulei virale, ca o consecinţă a ciocnirilor întâmplătoare a virionilor aflaţi în suspensie, cu suprafaţa celulei. Procesul adsorbţiei este ineficient, uneori fiind necesare milioane de ciocniri favorizate de mişcările browniene ale moleculelor din suspensie. Forţele *electrostatice* au rol important în realizarea adsorbţiei. Densitatea virionilor şi a celulelor influenţează decisiv eficienţa acestui proces, care este reversibil.

Fixarea ireversibilă (ataşarea) a virusului pe suprafaţa celulei, presupune acţiunea unui mecanism care stabilizează interacţiunea, până în momentul înglobării virionului. O particularitate a virusurilor şi anume *specificitatea* lor pentru o anumită categorie de celule, este în primul rând o specificitate de fixare, condiţionată de interacţiunea unei proteine virale (ligand* sau antireceptor), cu un constituient normal al suprafeţei celulare, care are rolul de *receptor de virus*.

* Ligandul este orice moleculă sau structură care mediază interacţiunea specifică sau nespecifică dintre un virus şi celulă sau dintre două celule.

Rolul interacţiunii specifice este demonstrat de faptul că acidul nucleic viral purificat este infecţios pentru un spectru mai larg de celule.

Gradul de specificitate a interacţiunii virus-celulă este diferit. Suprafaţa celulelor *vegetale* este acoperită cu ceară, pectină, dar mai ales cu un perete gros celulozic şi nu are receptori de virus. Nu se cunoaşte nici un virus infecţios pentru plante care să utilizeze receptori celulari specifici. Infecţia celulei vegetale este condiţionată de lezarea peretelui celulozic: virusurile sunt inoculate de vectori (artropode, nematode) care transmit virusul, sau prin leziunea mecanică a celulei.

Infecţia virală nu are consecinţe patologice dacă virusul nu se diseminează de la celula infectată iniţial (adeseori în frunze), la celulele învecinate. Trecerea virusului de la o celulă la alta este împiedicată de pereţii celulari. Dar, celulele conţin canale în peretele despărţitor (plasmodesme), ceea ce produce un continuum intercelular.

Diseminarea virusurilor la distanţă în ţesuturile plantei se face prin celulele perforate ale floemului.

Interacţiunea *fag-bacterie* este caracterizată printr-un grad înalt de specificitate (utilizată în scop practic pentru tipizarea fagică a tulpinilor bacteriene), iar aceea dintre virus şi *celula animală* are un nivel intermediar. Uneori, ataşarea virusului de celula animală este mediată de receptori foarte specifici, de aici decurgând *citotropismul*, cu consecinţe majore asupra patogenităţii virale. De exemplu, poliovirusul (un enterovirus) are specificitate de legare pentru celulele mucoasei intestinale şi pentru motoneuronii din coloanele anterioare ale măduvei spinării. In mod obişnuit, ciclul de multiplicare se desfăşoară în celulele mucoasei intestinale, fără manifestări clinice, dar după infecţia motoneuronilor survine paralizia musculară.

Se cunosc mai bine liganzii virali, decât *receptorii celulari*. Virionii înveliţi se leagă de receptorii celulari prin *glicoproteinele peplosului*, care adeseori proemină sub forma *spiculelor*.

Structurile de legare a virusurilor nude cu simetrie icozaedrică sunt situate la *vârfurile icozaedrului*. Ele sunt polipeptide ale capsidei sau sunt proteine fibrilare proeminente la vârfuri (de exemplu, fibra pentonică a adenovirusurilor).

Identificarea moleculelor cu rol de *receptor celular* de virus este dificilă, deoarece particula virală este un ligand de dimensiuni mari, ce interacționează cu o suprafață mare a celulei, la nivelul căreia se găsesc molecule de legare specifică și nespecifică. Pentru ca o moleculă membranară să aibă rolul de receptor pentru virus, în primul rând, trebuie să aibă o *densitate* suficient de mare pentru a asigura interacțiuni multiple cu ligandul viral. Pe de altă parte, virusul se poate lega de receptori diferiți pe diferite tipuri de celule. Totuși, s-au identificat receptorii celulari pentru câteva virusuri.

Din punct de vedere biochimic, receptorii celulari pentru virusuri sunt *glicoproteine, glicolipide* sau *glucide*. Specificitatea de legare este conferită de o parte a unei macromolecule sau de catenele glucidice ale conjugatelor glicoproteice.

Astfel, ligandul virusului influenza – *hemaglutinina* (o glicoproteină a peplosului) se leagă specific de resturile de *acid sialic* ale glicoproteinelor membranei citoplasmatice.

Receptorul pentru *acetilcolină*, de la nivelul sinapselor neuroefectoare poate avea rol de receptor și pentru *virusul rabic*.

Învelișul *HSV*$_1$ conține cel puțin 9 glicoproteine. Câteva (B, C, D, H, L) mediază legarea virionului de *heparan-sulfat**, cu rol de receptor celular. Glicoproteinele B și D mediază tropismul HSV$_1$ pentru neuronii SNC.

* Heparan-sulfatul este un proteoglican, o macromoleculă alcătuită dintr-o regiune centrală *proteică*, pe care se leagă covalent catene laterale de *glicozaminoglicani*, formând un *monomer proteoglicanic*. Mai mulți monomeri se leagă prin intermediul componentei proteice, de o moleculă lungă de *acid hialuronic*.

Glicozaminoglicanii (MPZ acide) sunt polizaharide ce conțin unități dizaharidice înalt repetitive.

Virusul Epstein Barr (EBV) produce mononucleoza infecțioasă, o maladie limfoproliferativă benignă. Este singurul virus al familiei pentru care s-a identificat un receptor de mare afinitate: *glicoproteina membranară CD*$_{21}$ (sau CR$_2$, adică receptorul pentru complement de tip 2, ce leagă C$_{3d}$). Receptorul CD$_{21}$ are rol în activarea limfocitelor B. În timpul activării cascadei C, C$_3$ este clivat în C$_{3b}$, care se leagă de complexele Ag-Ac. C$_{3b}$ este prelucrat proteolitic și rezultă C$_{3d}$. C$_{3d}$ atașat de complexul Ag-Ac, se fixează la limfocitul B, pe calea CR$_2$. C$_{3d}$ este ligandul natural pentru CR$_2$.

Receptorul pentru *HCMV* pare a fi molecula CMH I.

Receptorii celulari pentru virusurile nude cu simetrie *icozaedrică* sunt mai puțin cunoscuți.

Adenovirusurile se fixează prin intermediul fibrei pentonice, la o varietate de receptori celulari, inclusiv moleculele CMH I.

Receptorii pentru rhinovirusuri sunt moleculele intercelulare de aderență (ICAM-1). ICAM-1 se găsește pe celulele epiteliului cavității nazale și pe multe alte tipuri de celule din organism. Are 5 domenii extracelulare omologe domeniilor Ig (D1-D5), un domeniu transmembranar și un domeniu citosolic și face parte din suprafamilia Ig. Cele 5 domenii sunt așezate linear. Funcția normală este de a lega integrina LFA-1 de pe suprafața limfocitelor. Interacțiunea LFA-1-ICAM-1 mediază aderența dintre celulele epiteliale și limfocitele T care lizează celulele epiteliale infectate cu virus.

Expresia ICAM-1 pe celulele epiteliale ale cavității nazale este restrictivă în condiții normale, dar este indusă de mediatorii inflamației (IL-1, IFNγ, TNF) eliberați după infecția cu un rhinovirus, ceea ce ușurează diseminarea infecției. Pe de altă parte, inducția expresiei ICAM-1 este importantă pentru localizarea limfocitelor la situsul inflamației.

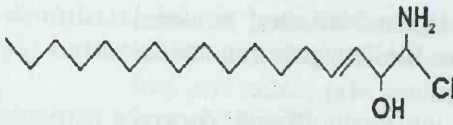
Molecula CD$_4$ are rol de co-receptor pentru recunoașterea ligandului HIV 1, în asociație cu moleculele CMH II, dar transmite și semnalul activator al celulei T.

Proteina CD$_4$ este un polipeptid de 55 kDa al membranei. Regiunea extracelulară conține 372 aminoacizi, ce formează 4 domenii, omologe cu ale moleculei de Ig.

HIV infectează și celule CD$_4^-$: neuroni, astrocite.

Utilizarea AMC specifici față de diferite componente membranare a dus la identificarea sfingolipidului* *galactozil ceramid* (Gal C), ca un posibil receptor pentru HIV pe membrana neuronală.

* Sfingolipidele sunt formate dintr-un aminoalcool cu 18 atomi de C (sfingozina). La gruparea –NH$_2$ a sfingozinei este legat un acid gras, (cu 24 atomi de C). Cele care conțin o grupare glucidică se numesc sfingoglicolipide.



Sfingozina

Celulele organismelor uman şi animal au receptori pentru un număr mare de agenţi infecţioşi. Teleonomic însă, moleculele cu rol de receptori nu sunt destinate legării virionilor, ci îndeplinesc diferite funcţii normale: de exemplu, unele au rol de *receptori de hormoni*. Moleculele care au rol de receptori de virus sunt polifuncţionale. Virusurile împrumută diferite molecule ale suprafeţei celulare, prin intermediul cărora dobândesc accesul în celulă. Numărul receptorilor de virus, pe suprafaţa unei celule este cuprins între 10^4–10^5.

Tropismul unor virusuri pentru anumite celule sau ţesuturi este determinat de specificitatea interacţiunii cu receptorul: de exemplu, tropismul HIV-1 pentru limfocitele T şi pentru macrofagele care prezintă receptorul CD_4; tropismul EBV pentru limfocitele B care conţin receptorul CD_{21}. Dar specificitatea şi distribuţia tisulară a receptorilor nu poate explica tropismul celor mai multe ribovirusuri, deoarece adeseori infecţia este abortivă: virionul este internalizat şi genomul este dezvelit, dar multiplicarea este stopată într-o etapă ulterioară, ceea ce sugerează existenţa unor factori celulari, care condiţionează sinteza macromoleculelor esenţiale ale ciclului de multiplicare virală (ARN, proteine). De exemplu, *virusul influenza* se fixează pe resturile de *acid sialic* ale glicoproteinelor şi glicolipidelor, care au o distribuţie ubicvitară în ţesuturi. Totuşi, infecţia cu virusul influenza este limitată exclusiv la celulele epiteliale ale tractului respirator al omului şi la modelele animale ale infecţiei. Pentru aceste virusuri, tropismul viral este condiţionat de existenţa *receptorilor celulari* şi de *starea de permisivitate* a celulei. Virusurile se multiplică în celulele care nu pot să declanşeze un răspuns antiviral mediat de IFN α/β.

Ataşarea de receptorii celulari este un proces reversibil. Dacă nu se produce internalizarea, virusul poate să se detaşeze (fenomen denumit *eluţie*), de pe suprafaţa celulei. Virionul care se detaşează din interacţiunea cu un receptor se poate reabsoarbi pe altă celulă. Unele virusuri au mecanisme speciale de eluţie. Detaşarea virionilor ortho- şi paramyxo- este mediată de neuraminidază (NA), o *esterază* care clivează resturile de acid sialic din catenele glucidice ale glicoproteinelor. Resturile de acid sialic rămân legate de HA şi previn legarea de alt receptor. De aceea, se admite că rolul NA este de a desializa glicoproteinele pe măsură ce ele sunt inserate în învelişul viral nascent.

De cele mai multe ori, ataşarea virusului determină modificări ireversibile în structura receptorului şi în mod obligatoriu urmează *internalizarea* (înglobarea virusului în celulă).

După legarea virusului, receptorii celulari se modifică. Astfel, glicoproteina CD_4, după interacţiunea cu HIV *se fosforilează*, o modificare esenţială pentru înglobarea virionului. Inhibiţia fosforilării cu inhibitori ai protein-kinazei blochează înglobarea şi virionii rămân la suprafaţa celulei. Fosforilarea declanşează semnalul reorganizării citoscheletului.

Chiar dacă virusul nu pătrunde în celulă, legarea sa de membrana citoplasmatică influenţează activitatea celulei. De exemplu, legarea VEB de suprafaţa limfocitului B poate iniţia activarea acestuia.

18.2. Pătrunderea virusului în celulă (infecţia propriu-zisă)

Faza de pătrundere sau de înglobare a virusurilor în celulele sensibile se desfăşoară după mecanisme diferite, derivate din complexitatea structurilor de suprafaţă ale celulei şi ale virionului.

Peretele mureinic al bacteriilor Gram pozitive, complexitatea structurală a peretelui bacteriilor Gram negative, precum şi natura celulozică a peretelui vegetal constituie bariere foarte eficiente faţă de infecţia virală. Celulele vegetale sunt infectate numai după leziunea mecanică a peretelui celulozic, iar fagii din seria T-par au un aparat complex, foarte specializat, prin intermediul căruia genomul viral este injectat în celula bacteriană.

Virusurile infecţioase pentru celulele animale sunt înglobate în întregime în celula sensibilă, consecinţa directă a absenţei peretelui celular.

Pătrunderea virusurilor în celula animală, după fixarea ireversibilă se poate produce prin două mecanisme fundamentale: *endocitoza şi fuziunea*.

Mecanismul predominant prin care virusurile pătrund în celula animală este *endocitoza* (denumită şi *viropexie*) (fig. 378), un proces analog celui de pinocitoză, caracteristic virusurilor nude (adeno-, reovirusuri), dar şi unor virusuri învelite (influenza, rhabdo-, poxvirusuri).

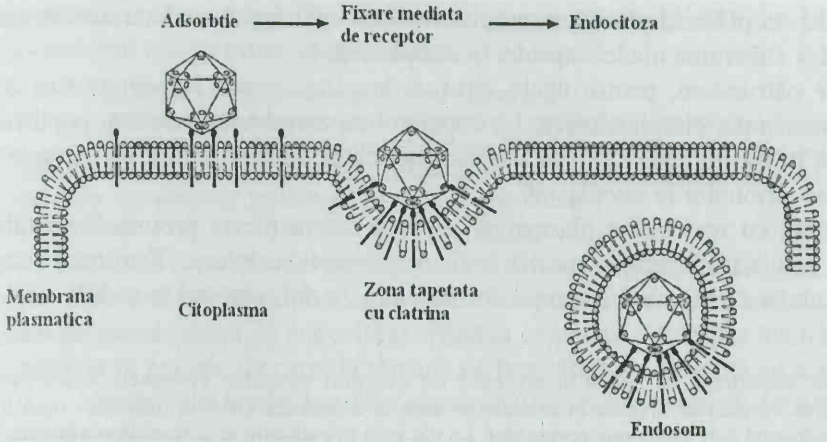


Fig. 378. Înglobarea unei particule virale nude prin mecanismul endocitozei mediată de receptori.

Interacțiunea inițială a virionului cu receptorii din membrana* celulară nu este suficientă pentru a declanșa endocitoza particulei legate, ci reprezintă *semnalul*** pentru inițierea agregării proteinelor contractile ale celulei și pentru formarea unor pseudopode.

* In membrana celulelor eucariote, lipidele nu sunt distribuite uniform (așa cum afirmă teoria mozaicului fluid). Unele zone ale membranei (microdomenii) sunt bogate în lipide particulare (sfingolipide, colesterol), cu care proteinele membranare integrate se asociază preferențial. Proteinele integrate se ancorează de catenele de acizi grași sau de GPI (glicozil-fosfatidil-inozitol). Microdomeniile formează pontoane lipidice relativ rezistente la solubilizare cu detergenți, sunt structuri mai rigide comparativ cu restul membranei, dar dinamice, adică pot fuziona formând pontoane mai mari sau se dezagregă în structuri mai mici. In pontoane se găsesc în special acele proteine care se leagă cu lipidele (GPI).

** Celulele (cu excepția fagocitelor profesioniste) au capacități endocitare foarte limitate. După fixarea virionului de receptor, este indusă *endocitoza*, ce constă în reorganizarea unor componente ale citoscheletului.

Formarea pseudopodelor ușurează interacțiunile multiple ale suprafeței virionului cu receptorii celulei. Proteinele contractile ale citoplasmei se activează și realizează închiderea particulei virale, într-o vacuolă de endocitoză, denumită *microveziculă* sau *pinosom* tapetat cu *clatrină**, printr-un mecanism asemănător închiderii unui fermoar (fig. 379).

* *Clatrina* este o proteină mare, oligomerică, ce formează o rețea pe suprafața internă a membranei plasmatice, favorizând intruzia membranei și formarea unei vezicule tapetată cu rețeaua moleculară, care ulterior poate fuziona cu alte organite celulare.

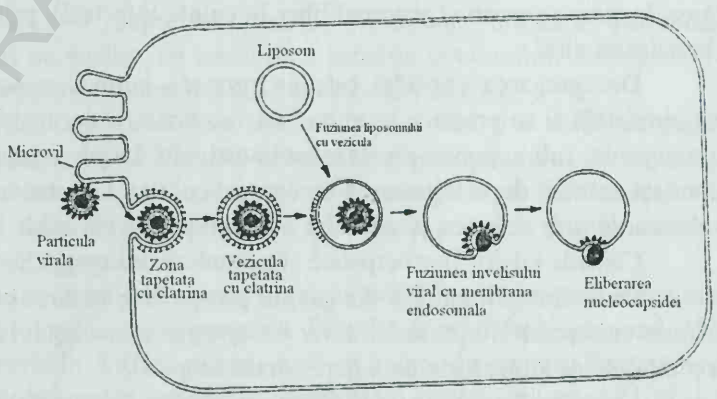


Fig. 379. Unele virusuri animale învelite intră în celulă, fiind endocitate în vezicule tapetate cu clatrină. Vezicula de fagocitoză își pierde învelișul de clatrină și fuzionează cu lizosomii. Scăderea pH în vezicală determină fuziunea învelișului viral cu membrana veziculei endosomale și eliberarea nucleocapsidei în citoplasmă.

Marginile libere ale membranei celulare intruzate, fuzionează și restabilesc integritatea suprafeței celulare, astfel încât virusul rămâne inclus într-o veziculă de endocitoză. Vezicula pierde învelișul de clatrină și fuzionează cu mici cisterne de reticul endoplasmic neted și cu lizosomi. Se formează un *endosom* al cărui pH se acidifică sub acțiunea unei *pompe protonice* din membrană. Pe măsură ce pH scade, proteinele capsidei suferă modificări de conformație și expun un domeniu hidrofob ce determină fuziunea cu membrana endosomului. Acesta este mecanismul de pătrundere a virionilor nuzi, prin *liza endosomului*. Virusul eliberat din endosom este fie sub forma nucleocapsidei (adeno-, herpes), fie sub forma nucleoproteinelor (enterovirusuri).

PUMS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru virusurile învelite, la pH acid al endosomului, învelişul viral fuzionează cu membrana endosomului, ceea ce favorizează eliberarea nucleocapsidei în citoplasmă.

Al II-lea mecanism de pătrundere, pentru unele virusuri învelite, constă într-un proces de *fuziune* a învelişului viral cu membrana citoplasmatică. La contactul cu membrana celulară, peplosul se dizolvă şi rămâne încorporat în membrană. La locul coalescenţei celor două structuri, se formează un "canal", care permite trecerea virionului în citoplasmă.

Fuziunea învelişului viral, cu membrana plasmatică necesită interacţiunea proteinelor virale "de fuziune" ale peplosului, cu constituienţii specifici ai membranei celulare. Fuziunea este modalitatea de pătrundere în celulă, caracteristică virusurilor învelite. Astfel, pătrund în celulă unele paramixo- şi poxvirusuri.

* Fuziunea membranară este importantă nu numai în procesele de transport vezicular. Proteinele virale care mediază fuziunea uşurează pătrunderea virusurilor învelite în celulele pe care le infectează.Virionul influenza intră în celulă prin EMR şi este eliberat în endosomi sub forma nucleocapsidei. La pH acid în endosom se activează o proteină a învelişului viral care catalizează fuziunea acestuia cu membrana endosomului. Astfel, acidul nucleic viral cu proteinele asociate sunt eliberate în citosol.

Genele care codifică proteinele de fuziune au fost clonate şi s-a făcut transfecţia celulelor mamaliene *in vitro*. Celulele exprimă proteinele virale pe suprafaţă şi în anumite condiţii fuzionează, formând celule gigante multinucleate.

Studiul structurii tridimensionale a proteinei de fuziune prin cristalografie cu raze x a evidenţiat că pH acid induce schimbarea conformaţională a proteinei de fuziune, care expune o regiune hidrofobă, ce interacţionează cu dublul strat lipidic al membranei.

Paramixovirusurile conţin, inclavată în peplos, *o proteină de fuziune* (F), care mediază fuziunea învelişului viral cu membrana celulei sensibile. Proteina F mediază fuziunea celor două structuri, numai dacă este *inclavată* în învelişul fosfolipidic viral şi dacă este ţinută în contact strâns cu membrana celulară, prin intermediul hemaglutininelor.

Cele două mecanisme de înglobare (endocitoza şi fuziunea) nu se exclud reciproc. Acelaşi virus învelit poate fi înglobat pe o cale sau alta, în funcţie de substratul celular. Mai mult, cele două mecanisme pot coexista frecvent pentru un virus dat, în raporturile sale cu o linie celulară.

Rareori, virionul pătrunde în celulă, prin modalităţi particulare, ce constau în liza locală a membranei plasmatice, la contactul cu virionul. Se produce liza peplosului viral şi a membranei celulare sau virionul trece intact prin breşa membranară.

Decapsidarea este procesul de conversie treptată a virusului, din starea de virion complet, la starea de *virus vegetativ* (genomul liber în celula infectată), prin pierderea capsidei şi, când este cazul, a învelişului viral.

Dezagregarea capsidei este un proces puţin cunoscut, datorită dificultăţilor de modelare experimentală şi se produce în trepte. La *reovirusuri*, decapsidarea se iniţiază înainte de contactul cu celula gazdă, sub acţiunea proteazelor intestinale. La *picornavirusuri*, capsida se dezagregă parţial la suprafaţa celulei, după legarea de receptorul celular. Cel mai adesea, decapsidarea are loc *în vezicula endosomală*, sub acţiunea proteazelor lizosomale şi a pH acid.

Capsida virusurilor herpetice şi adeno- se dezagregă la contactul cu *porul nuclear*.

Dezvelirea virusurilor din grupul pox se face în două etape: învelişul extern este degradat sub acţiunea enzimelor citoplasmatice, iar dezagregarea învelişului intern şi eliberarea ADN este catalizată de produsele de sinteză ale unor gene virale timpurii.

In vitro, dezvelirea virusurilor cu peplos este modelată sub acţiunea detergenţilor neionici (polieteri şi esteri poliglicerici, de exemplu, Tween 80). Aceştia interacţionează cu componentele hidrofobe ale membranei şi astfel peplosul este rupt şi solubilizat.

Transportul intracelular până la locul multiplicării este necesar numai pentru virusurile care se multiplică în nucleu. Cele care se multiplică în *citoplasmă* ajung uşor la sediul desfăşurării procesului, imediat după ce au străbătut membrana citoplasmatică.

Virusurile care se multiplică în *nucleu*, necesită transferul genomului şi a proteinelor asociate, prin membrana nucleară. Deplasarea lor pare a fi "orientată" de un tropism molecular ale cărui

mecanisme nu se cunosc. Reorganizarea unor componente ale citoscheletului* are un rol important în mecanismul transportului citoplasmatic.

* În celula eucariotă citoscheletul este format din:
– *structuri filamentoase stabile*, alcătuite din proteinele filamentelor intermediare;
– *structuri dinamice*: *microtubuli* formați din tubulină și *filamente* de actină. Acestea se pot asambla, dezasambla și redistribui rapid în celulă, ca răspuns la semnalele reglatoare ale funcțiilor celulare: progresia în ciclul celular, transportul intracelular al organitelor, motilitatea, controlul formei celulare.

Nu se cunoaşte nici un acid nucleic viral transportat în nucleu ca moleculă liberă.

Adeno- şi herpesvirusurile sunt transportate prin citoplasmă sub forma *nucleocapsidelor*, în vacuola membranară de endocitoză, până la contactul cu un por nuclear, prin care acidul nucleic este transferat în nucleu, iar capsida rămâne pe fața externă a membranei nucleare.

Proteinele virale asociate genomului au rol esențial în procesul de transport și îndeplinesc două funcții:

– furnizează *semnale specifice* și orientează transportul complexului spre nucleul celulei;
– conferă o *conformație stabilă* complexului, compatibilă cu transferul prin porii membranei nucleare.

Acizii nucleici monocatenari sunt transportați cu o eficiență mai mare deoarece moleculele monocatenare sunt polare, mai flexibile. De exemplu, ARN de influenza este transportat în nucleu sub forma ribonucleoproteinei. Proteinele complexului mediază transferul nuclear.

Dezoxiribovirusurile şi retravirusurile intră în nucleul celulei, fie ca particule întregi (nucleocapside), fie sub forma complexelor nucleoproteice (ADN şi proteinele asociate). Nu se cunoaşte mecanismul prin care nucleocapsida interacționează cu membranele nucleare. Transferul complexului nucleoproteic în nucleu se realizează probabil prin fuziunea nucleocapsidei cu membrana nucleară.

Virusurile nude din grupul *Papova* pătrund în nucleu ca virioni întregi, prin fuziunea nespecifică a veziculei de endocitoză, cu membrana nucleară externă, după care, virionul sau numai complexul nucleoproteic trece în nucleoplasmă, prin fuziunea vacuolei cu membrana internă.

Tranzitul acestor virusuri în nucleu este rapid (virionii de SV_{40} se găsesc în nucleu la 15 min. după infecție) şi se explică prin tropismul nuclear al proteinelor.

18.3 Sinteza ARNm viral

Transcrierea este prima treaptă a expresiei genelor virale şi urmează pătrunderii nucleocapsidei în celulă. Unele virusuri au enzime de transcriere asociate genomului. Activitatea lor începe foarte curând după dezagregarea parțială a capsidei şi se sintetizează ARNm.

Existența mesagerilor cu specificitate virală este o condiție esențială şi o restricție majoră pentru inițierea procesului de multiplicare virală. Virusul trebuie să ofere aparatului de sinteză al celulei, un ARNm pe care celula trebuie să-l recunoască şi să-l traducă în proteine. Generarea mesagerilor virali semnifică începutul subordonării aparatului de sinteză proteică şi trecerea de la sinteza proteinelor celulare, la sinteza celor specific virale.

În citoplasmă nu s-a detectat activitate ARN-polimerazică, astfel încât genomul virusurilor care nu au enzime proprii de transcriere, nu poate fi transcris. Datorită acestui fapt, genomul ADN (adeno-, herpes, papova) poate fi transcris în ARNm numai după ce ajunge în nucleu. Poxvirusurile sunt o excepție. Ele au propria enzimă de transcriere (ARN-polimeraza) pentru sinteza ARNm şi se multiplică în citoplasmă.

Ribovirusurile se multiplică în citoplasmă. Genomul viral ARN este transcris în ARNm de o enzimă proprie de transcriere, ori ARN genomic funcționează şi ca ARNm.

Sinteza ARNm viral este catalizată de două categorii de polimeraze:

– *ARN-polimeraza II celulară*, pentru virusurile a căror informație genetică este transcrisă în nucleu (dezoxiribovirusuri);

– *ARN-polimeraza virală*, pentru cele care se multiplică în citoplasmă (poxvirusuri şi ribovirusri). Cele două tipuri de polimeraze au omologii extinse ale secvenței de aminoacizi, inclusiv

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ale secvenței Gly-Asp-Asp. Acest tripeptid se găsește chiar și în ARN-polimeraza fagică și în reverstranscriptază. De aceea, se consideră că are rol în recunoașterea matriței de acid nucleic.

Cele mai multe molecule de ARNm viral sunt *monocistronice.*

18.3.1. Sinteza ARNm la dezoxiribovirusuri

Toate genomurile ADN lineare, mono- sau dublu catenare au secvențe repetate invers, fie la extremități (adeno-), fie atât la extremități, cât și în interior.

Genomul ADN viral se disociază de proteinele specifice de împachetare, acestea fiind înlocuite de *histonele* celulei. Astfel, ADN dobândește o structură nucleosomală, asemănătoare cu a ADN celular, favorabil proceselor de replicare și transcriere.

Sinteza ARNm este rezultatul transcrierii unicei catene, la cele cu genom monocatenar, sau a uneia dintre catene, la cele cu genom dublu catenar.

Clasificarea dezoxiribovirusurilor în funcție de tipul de acid nucleic genomic și de modul de transcriere a ARNm distinge :

– clasa I-a: virusurile cu genom ADN dc. ARNm este transcris prin mecanismul clasic al matriței ADN dc;

– clasa II-a: virusurile cu genom ADN mc. Catena de ADN are polaritate pozitivă ca și ARNm sau are polaritate negativă, opusă ARNm. Sinteza ARNm are loc numai după ce molecula genomică monocatenară este convertită la moleculă dublu catenară.

La majoritatea virusurilor cu genom ADN, se disting două faze ale transcrierii: *timpurie* și *tardivă.*

O mică parte a genomului, este transcrisă în *ARNm timpuriu, necesar sintezei proteinelor precoce.* Cea mai mare parte a genomului este transcrisă ulterior, în *ARNm tardiv.* Cele două etape ale transcrierii sunt separate în timp, de momentul *replicării genomului viral.* ARNm timpuriu și ARNm tardiv sunt transcrise de pe catenele genomice opuse.

Reglarea cantitativă a sintezei proteinelor timpurii și tardive se face post-transcriere, prin intermediul *ARN antisens.*

În *faza timpurie* a infecției productive se acumulează preponderent copiile *catenei timpurii,* care sunt traduse în proteine timpurii.

În *faza tardivă* a ciclului de multiplicare, ARN polimeraza II transcrie copii multiple ale *catenei opuse întregi,* din care, prin clivare rezultă *ARNm tardiv* și moleculele de *ARN antisens.* Prin asocierea moleculelor de ARNm cu ARN antisens se formează ARN dc și astfel ARNm timpuriu este inactivat. ARN dc s-a identificat cu anticorpii specifici marcați cu fluorocromi, în celulele infectate cu adenovirusuri, HSV, poliomavirusuri, SV_{40} și cu virus vaccinal.

Dezoxiribovirusurile infecțioase pentru celulele eucariote, au *informație genetică discontinuă,* deoarece, pentru a face economie de informație genetică, secvențele codificatoare ale unei proteine (exoni) se înnădesc într-o succesiune alternativă. O secvență necodificatoare pentru sinteza unei proteine, va avea rol de exon pentru ARNm al altei proteine. Consecința directă este că transcrierea genelor se face, inițial, într-o moleculă de *ARN premesager,* ce va fi prelucrat ulterior de aparatul enzimatic al celulei. Copiile de ARNm sunt rezultatul unui proces de prelucrare prin clivare și înnădire alternativă (splicing). Ulterior sunt supuse altor modificări: adăugarea secvenței de poli-A (100-200 de resturi) la capătul 3' și *metilarea* capătului 5' (bonetare). Bonetarea este esențială pentru stabilirea interacțiunii ARNm viral cu subunitatea ribosomală 40 S.

Prelucrarea ARNm al dezoxiribovirusurilor este catalizată de enzimele celulare. Atât transcrierea cât și prelucrarea ARNm au loc în nucleu.

La poxvirusuri, transcrierea ARNm este catalizată de o *ARN-polimerază* proprie virionului și procesul are loc în citoplasmă.

Moleculele de ARNm sunt *monocistronice* (conțin informația genetică pentru sinteza unei singure proteine).

La dezoxiribovirusuri, transcrierea și traducerea informației genetice sunt evenimente *separate spațial și temporal*: transcrierea are loc în nucleu, iar sediul traducerii este citoplasma. Fac excepție poxvirusurile, la care transcrierea ARNm și traducerea au loc în citoplasmă.

18.3.2. Originea ARNm la ribovirusuri

La ribovirusuri, ARNm are origini diferite în funcție de tipul de virus, de natura genomului său (ARN mono- sau dublu catenar), dar în special în funcție de *polaritatea* materialului genetic.

Polaritatea acizilor nucleici este stabilită convențional, în raport cu posibilitatea traducerii lor directe sau indirecte, în proteine. ARN genomic, tradus direct în proteine, fără să necesite o etapă prealabilă de transcriere este considerat a avea *polaritate (complementaritate) pozitivă*. ARN genomic, care este mai întâi transcris într-o moleculă de ARNm complementar are *polaritate negativă* (fig. 380).

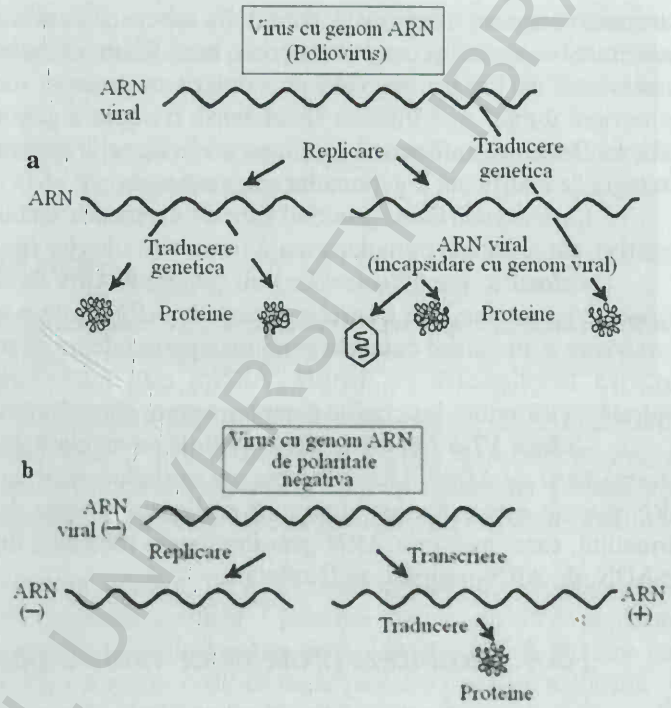


Fig. 380. Transcrierea și traducerea informației genetice la virusuri: (a) cu genom de polaritate pozitivă; (b) cu genom de polaritate negativă.

În ciclul de multiplicare a ribovirusurilor, nu se face distincția funcțională între ARNm timpuriu și tardiv, deoarece genomul viral funcționează alternativ ca matriță pentru sinteza ARNm și a ARN genomic.

După natura ARN genomic și după raportul său cu ARNm, ribovirusurile infecțioase pentru celulele animale, pot fi împărțite în 6 clase:

– *clasa I* cuprinde familiile *Picorna-, Togaviridae*, toți fagii ARN, cu genom de polaritate pozitivă, adică are rol *de ARNm* și codifică sinteza proteinelor structurale și funcționale. Genomul acestor virusuri este infecțios, pentru că funcționează direct ca ARNm pentru sinteza întregului set de proteine, inclusiv a ARN-polimerazei, care catalizează replicarea genomului viral. Virusurile cu genom de polaritate pozitivă au genom de dimensiuni mici.

Coronavirusurile au particularitatea că genomul lor, cu polaritate pozitivă, este transcris inițial de ARN-polimeraza virală, într-o copie de sens negativ, de aceiași lungime. Catena negativă, la rândul ei, este transcrisă în ARNm monocistronic, de diferite lungimi;

– virusurile *clasei a II-a* (*Paramyxo-, Rhabdo-, Filoviridae,* virusuri viscerotrope – Marburg, Ebola) au genom de *polaritate negativă*. Genomul lor antimesager nu funcționează ca ARNm și nu este tradus și nici transcris de celulă. Virionul conține o transcriptază proprie, *ARN-polimeraza dependentă de ARN*, care transcrie genomul de sens negativ, în ARNm monocistronic. Transcrierea este inițiată la un singur *promotor**, dar ARN-polimeraza recunoaște *secvențele semnal* și la sfârșitul fiecărei gene, este eliberată copia de ARNm *monocistronic*.

* Promotorii sunt secvențe de ADN care reglează expresia regiunilor codificatoare adiacente.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

– virusurile ***clasei a III-a*** (*Myxoviridae*) au *genom segmentat*, monocatenar, cu *polaritate negativă*. Fiecare segment genomic este transcris în propriul său mesager. Fiind de polaritate negativă, transcrierea catenei genomice în ARNm este catalizată de o *ARN-polimerază* dependentă de ARN, existentă în virion, analogă funcțional cu enzima de transcriere a altor ribovirusuri cu catena genomică ARN de polaritate negativă. ARN-polimerazele virusului influenza sunt defective din punct de vedere funcțional: nu inițiază sinteza ARNm şi nici nu-l modifică prin bonetare sau metilare internă. Aceste funcții sunt suplinite de ARN-polimeraza II a celulei, cea care catalizează inițierea sintezei şi metilarea ARNm celular. Toate virusurile cu genom de polaritate negativă sunt învelite;

– ***clasa a IV-a*** (*Arenaviridae*), au genom ARN monocatenar, format din *două segmente*. Particularitatea sa funcțională constă în aceea că *jumătatea 3'* a fiecărui segment genomic are o *polaritate negativă* şi este transcrisă în ARNm complementar, de o transcriptază virionică, iar jumătatea 5' a fiecărui segment are polaritate pozitivă. Pentru jumătatea 5', ARNm rezultă după o transcriere dublă: mai întâi se sintetizează o copie a genomului şi ulterior, aceasta este transcrisă în ARNm. Deoarece informația este înscrisă în direcții opuse în cele două jumătăți ale fiecărui fragment, strategia de codificare a genomului este *ambisens*.

La *Bunyaviridae*, genomul este de asemenea ambisens, deoarece atât ARN genomic (de sens negativ), cât şi catena complementară transcrisă ulterior (de sens pozitiv), funcționează ca ARNm;

– ***clasa a V-a*** (*Reoviridae*) au genomul *ARN dublu catenar, segmentat*. Fiecare din cele 10 segmente genomice este transcris separat la ARNm, de o transcriptază a virionului. Transcrierea este *conservativă*, deoarece catenele genomice parentale nu se separă şi numai catena de complementaritate negativă funcționează ca matriță. ARNm este monocistronic. ARN genomic rămâne în regiunea centrală a virionului, iar copiile complementare sunt eliminate prin capsida parțial dezintegrată.

– ***clasa VI-a*** (*Retraviridae*) prezintă particularitatea că genomul lor se replică printr-o *copie intermediară de ADN*. ARN genomic are complementaritate pozitivă, dar nu funcționează ca ARNm. ARN pur nu este infecțios pentru că replicarea sa este dependentă de *revers-transcriptaza* asociată virionului, care transcrie ARN genomic într-o moleculă de ADN. ARNm este transcris din molecula de ADN, de ARN-polimeraza II celulară.

18.4. Biosinteza proteinelor virale timpurii

Sinteza proteinelor cu specificitate virală este evenimentul esențial al ciclului de multiplicare virală şi necesită existența unui mesaj viral generat în etapa transcrierii. Sinteza proteinelor virale semnifică traducerea unui mesaj străin celulei şi este supusă unor restricții.

O restricție majoră a sintezei proteinelor virale derivă din faptul că în celula infectată, exprimarea genelor virale este în competiție cu activitatea numeroaselor gene celulare funcționale. O singură copie a genomului viral, inițiază programul de dominanță asupra programului celular, de 10^4–10^6 ori mai mare, care este deja exprimat. Mesagerii virali sunt în competiție, pentru traducere, cu mesagerii celulari.

Proteinele virale sunt sintetizate de aparatul celular de sinteză proteică (aminoacizi, ARNt, ribosomi, enzimele catalizatoare).

Aparatul de sinteză proteică al celulei traduce numai mesaje unitare şi nu recunoaşte situsurile multiple de inițiere a traducerii unui ARNm viral policistronic. La unele virusuri, *ARNm este policistronic*, copie a câtorva gene şi este tradus într-o *poliproteină* gigantă, clivată ulterior în proteine individuale de mărime adecvată. *Proteazele cu rol în prelucrarea poliproteinei par a fi de origine celulară şi virală.* Poliproteina nu se evidențiază la electroforeză în gel de poliacril-amidă, deoarece este clivată chiar în timp ce se sintetizează. Inhibiția clivajului, prin încorporarea analogilor aminoacizilor, sau prin creşterea temperaturii, face posibilă detectarea ei la electroforeză.

Proteinele virale se sintetizează pe *polisomii* citoplasmatici. Pentru virusurile care se multiplică în nucleu, proteinele sintetizate în citoplasmă trebuie să fie transportate în nucleu, pentru a-şi îndeplini funcția specifică: enzime de replicare a genomului sau proteine virale structurale.

Proteinele virale precoce aparțin următoarelor categorii:

1) *Proteine de reglare* cu rol de instituire şi menținere a ordinii virale. Ele inhibă sinteza macromoleculelor specifice celulei, prin modificarea specificității sistemelor enzimatice de replicare,

transcriere şi traducere, astfel încât sintezele macromoleculare ale celulei sunt stopate şi metabolismul este orientat în sensul sintezei constituienţilor virali. Proteinele virale cu rol în controlul expresiei genelor sunt multifuncţionale;

2) *Proteine matriceale* cu rolul de a delimita viitoarea "fabrică de virus", adică teritoriul celular în care se multiplică virusul;

3) *Proteine-enzime* de tipul polimerazelor: ADN- şi ARN-polimeraza, nucleaze (enzime de clivare), ligaze, proteaze. Virusurile codifică *serin-proteaze, cistein-proteaze* şi *aspartic-proteaze*, dar nu codifică metaloproteaze. *Serin-proteazele* au un rest de *Ser* reactivă (grupul –OH) la situsul activ, care împreună cu *Asp* şi *His* formează triada catalitică, ce clivează legăturile peptidice. *Cistein-proteazele* au o diadă catalitică formată din resturi de *Cys* şi *His*. Ambele categorii formează intermediari *enzimă-substrat*. *Aspartic-proteazele* virale sunt asemănătoare cu omologele lor celulare (pepsina, gastrina, catepsina D, renina), în general sunt active la pH acid şi nu par să formeze intermediari enzimă-substrat.

Cele mai multe virusuri, în faza timpurie exprimă o cantitate foarte limitată de informaţie genetică. Numai poxvirusurile exprimă 30-50 de funcţii în faza precoce.

18.5. Replicarea genomului viral

În etapa timpurie se sintetizează proteine virale cu rol enzimatic, care condiţionează procesul replicării virale şi implicit, evoluţia complexului virus-celulă gazdă.

Pentru replicarea ADN viral sunt utilizaţi precursorii din mediul de creştere a celulelor, deoarece ADN celular nu este degradat. Celula sintetizează nucleotide, din care se sintetizează acizii nucleici virali. Procesul replicării genomului viral a fost studiat prin tehnica *autoradiografiei*, ce constă în adăugarea în mediul nutritiv, a precursorilor nucleotidelor, marcaţi radioactiv şi detectarea lor ulterioară în ADN viral. Replicarea genomului viral ADN este dependentă de acţiunea catalitică a unei ADN-polimeraze.

Virusurile mici utilizează ADN-polimeraza celulară, iar cele complexe (adeno, herpes), codifică sinteza ADN-polimerazelor proprii. Virusurile herpetice codifică 7 proteine-enzime, cu rol în replicarea genomului. Virusurile ADN se multiplică numai în celulele care se divid. Unele codifică proteine care induc intrarea celulei în stare de diviziune, iar cele complexe codifică multe proteine necesare replicării.

Replicarea ADN viral se face după modelul semiconservativ. Mecanismul replicării s-a studiat la toate familiile de dezoxiribovirusuri.

18.5. Replicarea genomului viral ADN

Pentru replicarea ADN, uneori, rolul de primer revine unei proteine legată la capetele 5'. La genomul linear, originile replicării sunt localizate în SRI de la extremităţi. La *adenovirusuri*, genomul este o moleculă dublu catenară, lineară, de 2000–2500 kDa (circa 36 kbp), cu *secvenţe repetate invers*, lungi de 100–140 nucleotide, la ambele extremităţi ale celor două catene (secvenţa de baze la un capăt al unei catene (de exemplu 5') este repetată în ordine inversă pe catena opusă, în acelaşi sens (5'–3'). Ele permit circularizarea moleculelor monocatenare care apar în timpul replicării (fig. 381). La cele două capete 5', catenele genomice sunt asociate covalent cu o *proteină de 55 kDa.*

Deşi celula ar putea replica ADN viral, cele mai multe virusuri ADN codifică propriile ADN-polimeraze, probabil pentru o eficienţă superioară. Replicarea ADN este *semiconservativă* şi *asimetrică.* Asimetria constă în faptul că numai una dintre catene este copiată într-o catenă complementară.

Replicarea este iniţiată la capătul 3' al unei catene genomice parentale, la care se ataşează complexul ADN-pol şi o proteină de 80 kDa, precursoare a proteinei (pTP) de 55 kDa de la capătul 5'. Proteina pTP de la capătul 3' are rol de *primer.* Sinteza ADN începe cu adăugarea dCMP (deoxicitidin-monofosfat), la proteina primer, formând o legătură esterică. ADN-polimeraza* alungeşte catena ADN în sensul 5' – 3', prin polimerizare succesivă la capătul 3'.

*ADN-polimeraza nu iniţiază sinteza *de novo* a unei catene de ADN, având nevoie totdeauna de un *primer*, ci alungeşte o catenă preexistentă. De obicei, primerul este un fragment de ARN complementar faţă de una dintre catene. Ulterior, secvenţa de ARN este înlocuită cu una de ADN.

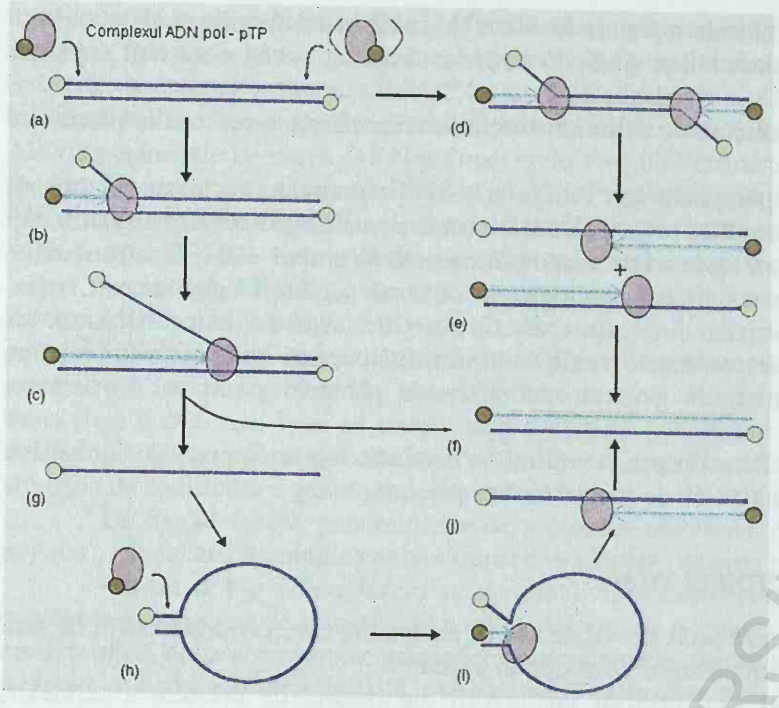


Fig. 381. Schema generală a replicării ADN la adenovirusuri. Linia de nuanță închisă reprezintă ADN parental. Linia de nuanță deschisă semnifică noua catenă de ADN. Săgețile pe catenele noi marchează capătul 3'. Cercurile de nuanță deschisă reprezintă proteina terminală (PT) atașată la capătul 5' al catenei parentale, iar cercurile de nuanță închisă semnifică precursorul proteinei terminale (pPT), cu rol de primer pentru sinteza noilor catene ADN. Ovalul reprezintă ADN-polimeraza. *a.* Complexul ADN-pol-pPT se asociază cu molecula genomică dublu-catenară. *b, c.* O singură catenă genomică este dislocată în direcția 5' – 3', iar catena 3' are rol de matriță pentru catena nouă *d.* Ambele catene ale moleculei parentale, concomitent, au rol de matrițe pentru sinteza noilor catene. e. Cele două catene matrițe, împreună cu catenele nascente se separă. *f.* Sinteza catenei noi este completă. *g, h.* Catena parentală se circularizează prin împerecherea bazelor din secvențele terminale repetate invers. *i.* Catena circulară are rol de matriță pentru sinteza unei catene noi (după K. N. Leppard, 2008).

Catena se alungește în direcția 5'–3' pe catena matriță și nu necesită fragmente Okazaki. Catena nascentă deplasează catena preexistentă de aceiași polaritate și împreună cu catena matriță de polaritate opusă, formează o moleculă dublu catenară.

Catena deplasată are rol de matriță pentru sinteza unei catene complementare. După același mecanism se formează o moleculă dublu-catenară, lineară.

Virusurile din grupul Papova au genomul format dintr-o moleculă de ADN dublu catenară, circulară. Replicarea moleculei circulare se realizează după *modelul semiconservativ, bidirecțional* și este simetrică. După același mecanism se replică ADN bacterian, precum și ADN din organite (mitocondrii, cloroplaste).

Replicarea este precedată de despiralizarea celor două catene, ca rezultat al inciziei succesive. Inciziile sunt reparate rapid după ce s-a produs despiralizarea.

Enzimele care incizează și repară rapid breșele moleculei de ADN se numesc topoizomeraze. Rolul lor este acela de a relaxa ADN supraspiralizat în sens pozitiv sau negativ. Ele produc modificări ale conformației spațiale (topologice) a moleculei de ADN, prin modificarea gradului de spiralizare.

Virusurile *Papova* nu au topoizomeraze proprii, ci utilizează enzimele celulare.

Replicarea moleculei circulare începe la un punct fix, denumit *originea replicării*, iar punctul în care catenele moleculei parentale se separă și sunt sintetizate catenele noi se numește *bifurcație de replicare.*

De la origine, bifurcația de replicare se deplasează cu foarte puține excepții, în ambele direcții ale moleculei circulare. Din această cauză, o moleculă de formă circulară, în cursul procesului de replicare are aspectul literei grecești theta (θ), iar mecanismul de replicare se numește *theta.*

Rezultatul replicării este o pereche de molecule circulare, denumite *catenani.* Catenarea este procesul de legare a două molecule circulare de ADN într-o structură supramoleculară, iar *decatenarea* este procesul invers, de separare a celor două molecule.

La *herpesvirusuri*, genomul este o moleculă de ADN dublu catenară, lineară, de 150 kbp. Molecula este alcătuită din *două domenii* cu secvență unică: unul mai mare, notat cu *L* (*L*arge) și altul mai scurt, *S* (*S*hort).

La *Herpes simplex virus* (HSV), fiecare secvență este flancată la extremități, de câte o secvență de nucleotide repetate în ordine inversată (SRI), de câte 300-400 de baze. O particularitate a genomului HSV este orientarea întâmplătoare a celor două secvențe unice, astfel încât într-o populație de virioni se găsesc simultan cele 4 variante de genom linear: *P* (*P*rototip), *IL* (*I*nverted *L*), *IS*

(*Inverted S*) şi *ISL* (Inverted *S* şi *L*). Ele apar ca o consecinţă a asocierii aleatorii în oricare dintre cele două orientări a celor două domenii genomice (fig. 382).

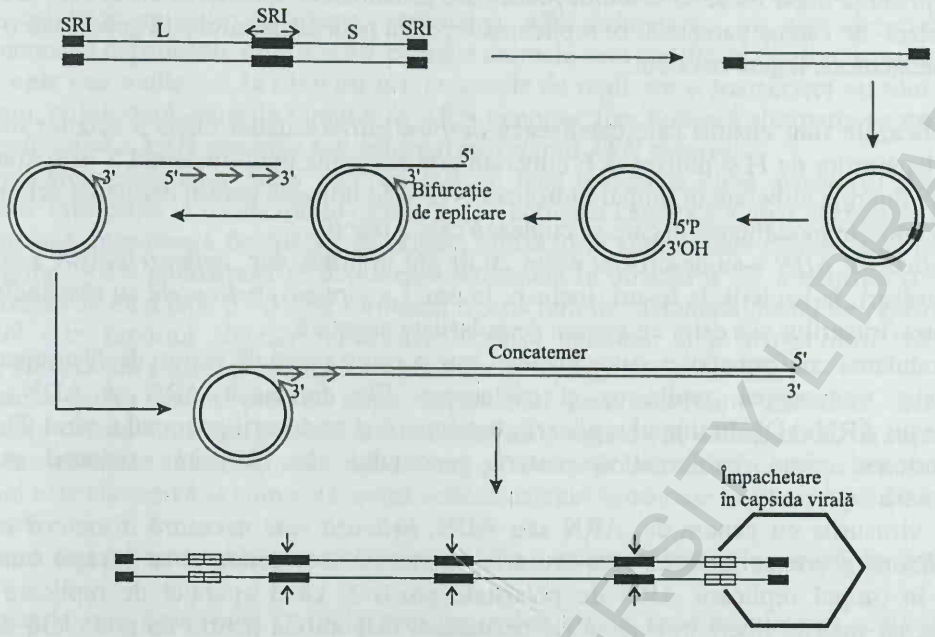


Fig. 382. Reprezentarea schematică a replicării genomului la herpesvirusuri după modelul literei sigma (σ).

Replicarea genomului se face prin intermediul moleculelor circulare. După ce ADN viral ajunge în nucleul celulei, secvenţele terminale repetate în ordine inversă (SRI) sunt supuse acţiunii limitate a unei *exonucleaze*, la nivelul uneia dintre catene. Secvenţele rămase se împerechează, formând o moleculă circulară, dublu catenară, covalent închisă.

Într-o primă etapă, replicarea moleculei circulare se face ciclic, după modelul semiconservativ al *cercului simplu*. Ulterior, moleculele circulare generate în prima etapă a transcrierii se replică după modelul *cercului rotativ*. Un rol esenţial în procesul de replicare îl au *helicazele**.

Una dintre catenele moleculei circulare (catena leading*) este incizată la un situs specific, sub acţiunea unei endonucleaze virale şi rezultă două capete libere: 3'OH şi 5'P. Cealaltă catenă rămâne circulară, închisă covalent.

La capătul 3' al catenei incizate (catena "leading") este iniţiată sinteza replicativă. Capătul 3'OH are rol de *primer* şi creşte prin polimerizarea nucleotidelor, catalizată de ADN-polimeraza. Catena circulară funcţionează ca *matriţă rotativă*.

Polimerizarea are loc totdeauna, prin alungirea unei catene primer în direcţia 5'–3', începând de la capătul 3'OH al catenei incizate. Când bifurcaţia de replicare a parcurs cel puţin odată catena circulară cu rol de matriţă şi catena incizată (leading*) este de două ori mai lungă în raport cu momentul iniţial, ea poate fi copiată în sens invers, pe calea replicării discontinue a *fragmentelor Okazaki*, de un alt complex enzimatic de replicare. Astfel, molecula nou sintetizată devine dublu catenară.

* Catena "leading"(*to lead*, lb. engleză = a conduce) este cea care expune capătul 3'OH liber şi este transcrisă într-o catenă complementară continuă în direcţia 5'–3'.

Catena leading continuă să se rotească pe matriţa circulară, fiind copiată succesiv. Se formează astfel mai multe molecule concatemere, în tandem, în conexiune cap-coadă.

Rezultatul intermediar al replicării este un cerc cu o ramificaţie laterală, care se aseamănă cu litera grecească *sigma* (σ) şi de aceea, replicarea după modelul cercului rotativ se numeşte *replicare sigma*.

Concatemerul poate fi separat de molecula circulară prin clivare, sub acţiunea unor *endonucleaze*. La rândul lor, capetele catenei incizate ale moleculei circulare sunt reunite sub acţiunea unei *ligaze* şi se reface continuitatea covalent închisă a structurii circulare dublu catenare.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În procesul morfogenezei virale, concatemerii lineari sunt clivați în molecule dublu catenare lineare, de lungimea genomului.

Replicarea după modelul cercului rotativ are următoarele caracteristici: a) catena leading este legată covalent de catena parentală; b) replicarea repetată pe matrița circulară generează o ramificație laterală concatemeră, legată covalent.

Helicazele sunt enzime care catalizează *despiralizarea* catenei duble a acizilor nucleici, prin disocierea legăturilor de H şi utilizează E eliberată prin hidroliza unui nucleotid 5'-trifosfat (NTP), de obicei ATP. Energia eliberată în timpul hidrolizei NTP este utilizată pentru derularea acidului nucleic, deşi nu se cunoaşte modalitatea în care se cuplează cele 2 reacții.

Helicazele ADN s-au descris cu peste 20 de ani în urmă, dar *helicazele ARN* s-au evidențiat recent la virusuri, la bacterii, la levuri, inclusiv la om. La virusuri, *helicazele* au răspândire largă, cu excepția retravirusurilor şi a celor cu genom de polaritate negativă.

Modularea conformației acizilor nucleici este o etapă esențială pentru desfăşurarea proceselor fundamentale: transcrierea, replicarea şi traducerea. Ele derulează ARN şi ADN dc, dar şi heteroduplexul ARN-ADN în timpul replicării, transcrierii şi traducerii genomului viral. Helicaza ar fi necesară oricărui virus, indiferent de natura genomului său, datorită existenței nucleotidelor complementare.

La virusurile cu genom dc, ARN sau ADN, *helicaza este necesară disocierii catenelor în timpul replicării şi transcrierii.* La ribovirusurile monocatenare, genomul se găseşte tranzitoriu sub formă dc: în timpul replicării ARN de polaritate pozitivă, când aparatul de replicare trebuie să funcționeze, iar matrița liberă trebuie să fie permanent disponibilă pentru un nou ciclu de replicare. Rolul helicazei ar fi acela de a *disocia* perechile intramoleculare de baze şi de a preveni formarea perechilor extinse între matrice şi catena complementară nascentă. Virusurile cu genom mai mic de 5,8 kb nu codifică helicaza.

Funcțiile helicazei:

- helicazele ar putea fi implicate în controlul fidelității replicării (funcția "proof reading");
- pentru inițierea precoce a replicării şi prevenirea formării perechilor între catena de ARN nascent şi catena matriță (ARN sau ADN);
- pentru inițierea traducerii, facilitând legarea de subunitatea 40 S a ribosomului.

Testul helicazei. Testul clasic foloseşte un substrat ARN susceptibil de derulare, alcătuit din 2 catene ARN complementare, dintre care una este marcată radioactiv. Substratul este incubat cu proteina cercetată pentru activitatea de helicază, în prezența NTP şi Mg^{2+}. Produsele reacției se separă prin EF pe un gel denaturant. ARN mc migrează mai rapid decât cel dc şi catena deplasată se observă direct. Catena mai lungă este considerată convențional, ca matriță, iar cea scurtă este catena în curs de sinteză.

Retravirusurile folosesc o helicază celulară pentru a derula ARN sintetizat de pe matrița de ADN integrat.

Parvovirusurile au ca genom o moleculă de ADN monocatenară, lineară. Capetele moleculei au secvențe palindromice*, repetate în ordine inversă, care formează "bucle în ac de păr". Regiunile palindromice terminale reprezintă 5% din genom şi sunt esențiale pentru replicarea acestuia, deoarece constituie secvențele primer pentru acțiunea catalitică a ADN-polimerazei. Replicarea este catalizată de aparatul enzimatic al celulei.

* Palindromul este o succesiune de baze, simetrică față de un punct central, astfel încât secvența bazelor este aceiaşi atât în sensul 3' --- 5', cât şi în sensul 5' --- 3'.

Într-o primă etapă, genomul monocatenar este convertit la forma dublu catenară, prin împerecherea bazelor complementare, denumită *intermediar de replicare.*

Intermediarul dublu catenar este incizat într-o poziție opusă situsului de inițiere pentru sinteza catenei complementare şi generează un capăt 3'OH, de la care secvența repetitivă este alungită pe catena complementară cu rol de matriță. Se sintetizează astfel, catene multiple cu polaritate genomică (pozitivă). Catenele nou sintetizate, cu polaritate genomică, rămân în configurație lineară şi constituie genomul virionilor progeni sau se replică după acelaşi mecanism, amplificând rata sintezei catenelor genomice.

18.6. Replicarea şi transcrierea genomului viral ARN

Replicarea şi transcrierea ARN viral sunt catalizate de ARN-pol dependentă de ARN. În citoplasma celulelor animale şi umane, activitatea *ARN-polimerazei* nu este detectabilă. Toate ARN-polimerazele dependente de ARN din celulele animale sunt codificate de ribovirusuri.

De cele mai multe ori, la ribovirusuri, procesele de replicare şi transcriere nu sunt separate în timp şi spaţiu, ci interferă, datorită faptului ca ARN genomic funcţionează alternativ ca matriţă pentru *copierea replicativă* a ARN genomic sau pentru *transcrierea ARN mesager.*

Replicarea genomului ARN monocatenar se face totdeauna după următorul model: catena genomică este convertită la forma dublu catenară, sub acţiunea catalitică a unei enzime de replicare (o ARN-polimerază dependentă de ARN), de origine virală, prin sinteza unei catene complementare de aceiaşi lungime. ARN-polimeraza se deplasează totdeauna în direcţia 3'–5' a matriţei şi sintetizează ARN în direcţia de elongaţie 5'–3'. Se formează o structură dc, denumită *formă de replicare.* Forma dc de ARN este suportul *sintezei replicative* a ARN genomic şi al *transcrierii ARNm.* ARN-polimeraza nu necesită existenţa unui primer pentru a iniţia sinteza catenei noi.

Sinteza noilor catene are loc după mecanismul *semiconservativ asimetric.* Din forma de replicare dublu catenară, catena genomică este deplasată progresiv de catena nouă, în curs de sinteză. Catenele nou sintetizate au aceiaşi secvenţă de baze şi aceiaşi polaritate ca şi catena genomică. Sinteza catenelor noi este succesivă şi completă, adică sinteza catenei următoare nu începe până ce precedenta nu s-a eliberat.

Forma de replicare dublu catenară, împreună cu o catenă nascentă formează un *intermediar de replicare.*

Catenele nou sintetizate, cu polaritate genomică, devin suportul sintezei replicative sau se asociază cu proteinele capsidale.

La virusurile care au ca genom o catenă de ARN cu *polaritate pozitivă* (*Picorna-, Togavirus*), catena de sens pozitiv a formei dc este dislocată de catena nascentă a intermediarului de replicare, iar catena de *sens negativ* are rol de matriţă pentru sinteza copiilor de polaritate pozitivă, care îndeplinesc două roluri:

a) unele, după prelucrarea prin bonetare* (metilare la capătul 5'), metilare internă şi adenilare la capătul 3', au rolul de ARNm;

* Bonetarea sau capping (*cap*, lb. engleză = bonetă) semnifică o etapă a prelucrării post-transcriere a moleculei de ARNm, ce constă în adăugarea la capătul 5' a metil-G. "Bonetarea" este esenţială pentru interacţiunea moleculei de ARNm cu ribosomii în procesul traducerii informaţiei genetice.

b) altele funcţionează ca matriţe pentru sinteza unor catene noi, de polaritate negativă, amplificând rata sintezei ARN cu specificitate virală.

La virusurile cu *genom ARN de polaritate pozitivă*, deoarece ARN genomic funcţionează ca ARNm, ARN-polimeraza se sintetizează în celulă, după infecţie şi nu este componentă a virionului. Din această cauză, ARN genomic este infecţios (fig. 383).

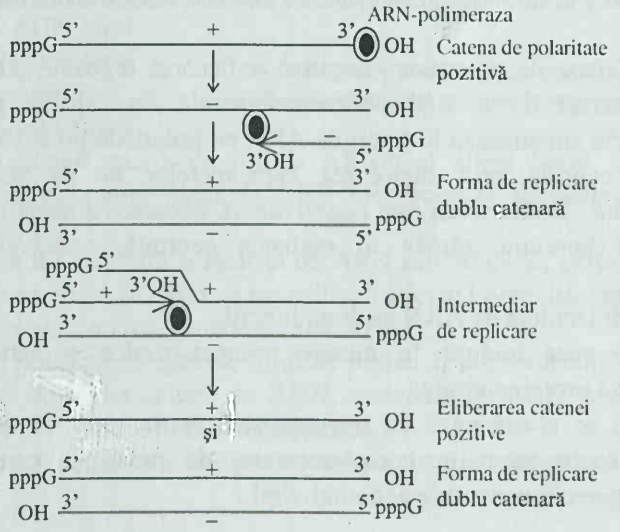


Fig. 383. Modelul replicării genomului viral ARN cu polaritate pozitivă.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

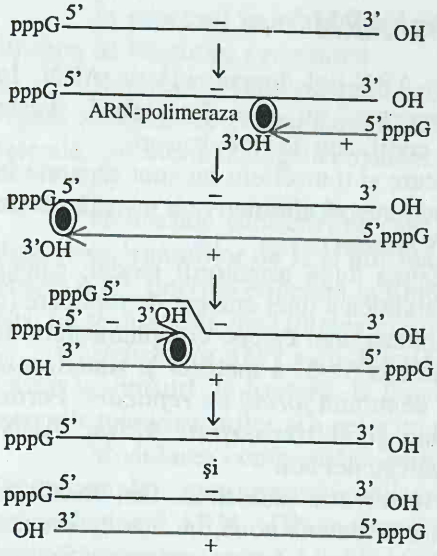


Fig. 384. Modelul replicării genomului viral ARN cu polaritate negativă.

La virusurile cu genom ARN de polaritate negativă (grupul *Mononegavirales*- paramixo-, rhabdo-, filovirusuri), mesagerii şi catenele genomice sunt transcrise de pe matriţe diferite: catena de polaritate negativă a formei dublu catenare funcţionează ca matriţă pentru transcrierea *ARNm monocistronici*, iar cea de polaritate pozitivă este transcrisă în copii de *lungimea genomului* (fig. 384), de polaritate negativă, cu rol de ARN genomic. Replicarea se deosebeşte de transcriere prin modul în care progresează ARN-pol: continuu sau secvenţial.

Virionul conţine o transcriptază proprie – o ARN-polimerază dependentă de ARN, care catalizează sinteza catenei de ARN complementar şi a ARNm. De aceea, ARN purificat al acestor virusuri nu este infecţios.

Virusurile cu genom ARN se multiplică în citoplasmă, cu excepţia *virusurilor gripale*, la care, replicarea şi transcrierea genomului au loc în nucleu. La mixovirusuri, transcrierea moleculelor cu rol de ARNm, ca şi a celor genomice, este catalizată de aceiaşi ARN-polimerază virală, dar enzima este defectivă funcţional, deoarece alungeşte o catenă preexistentă, dar nu iniţiază sinteza de novo*.

* Polimeraza PB_2 şi proteina NS_1 clivează capetele 5' bonetate ale mesagerilor celulari, pe care polimeraza PB_1 le foloseşte ca primeri pentru sinteza replicativă şi pentru transcrierea genomului viral. Altă explicaţie a dependenţei de nucleu rezidă în aceea că mesagerii pentru sinteza proteinelor M_1 şi M_2, respectiv NS_1 şi NS_2 sunt prelucraţi prin clivare şi înnădire.

Unele copii de polaritate pozitivă, cu rol de ARNm sunt "bonetate" (capping), metilate şi poliadenilate de enzime *celulare nucleare* şi sunt transferate în citoplasmă, iar altele rămân în nucleu, cu rol de matriţă pentru sinteza ARN genomic (de polaritate negativă), pe toată durata procesului infecţios.

Replicarea genomului ARN dublu catenar multipartit al reovirusurilor* (10 segmente) este simultană cu transcrierea (fig. 385).

* Reovirusurile se transmit pe cale orală şi sunt prelucrate de proteazele digestive în lumenul intestinal. Dezvelirea implică parţial, digestia proteolitică a capsidei externe. Proteoliza nu inactivează virusul, ci remodelează capsida externă. Virusul este activat, după eliberarea proteinei majore δ3, clivajul proteinei μ1c şi a HA δ1. Virusul prelucrat proteolitic aderă de *celulele M* şi de enterocite. Rezultă particule subvirale, identice cu cele obţinute *in vitro* sub acţiunea chimotripsinei.

Catena de polaritate negativă a fiecărui segment genomic este transcrisă de o ARN-polimerază virală, în capsida parţial deschisă. Se sintetizează 10 tipuri de ARN cu polaritate pozitivă, care părăsesc capsida prin dizlocarea capsomerelor de la vârfurile icozaedrului. Transcrierea este *conservativă,* deoarece ambele catene ale ARN genomic rămân în regiunea centrală, nedezvelită a virionului.

Moleculele de ARN au două funcţii:

a) sunt traduse în mesaje monocistronice şi astfel se sintetizează proteine virale;

b) se asamblează cu o precapsidă şi au rolul de matriţe pentru sinteza catenelor complementare, de polaritate negativă. Catenele perechi constituie genomul viral.

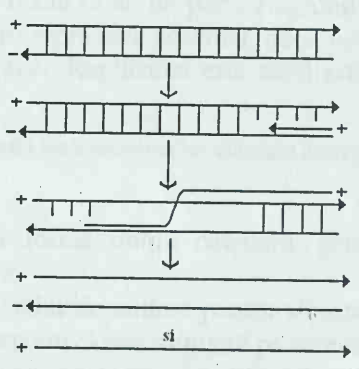


Fig. 385. Modelul replicării genomului ARN dublu catenar al reovirusurilor. Amănunte în text.

18.6.1. Replicarea şi transcrierea ARN printr-un intermediar ADN

Replicarea ARN printr-un intermediar ADN este caracteristică *retravirusurilor*. Genomul lor este reprezentat de o catenă de ARN, care, în fiecare virion se găseşte în dublu exemplar, ceea ce conferă caracterul *diploid* al genomului acestor virusuri. Nu se cunoaşte modul de asociere fizică a celor două molecule de ARN.

Genomul ARN al retravirusurilor este replicat printr-un flux de informaţie genetică ce trece prin ADN, proces denumit *transcriere inversă*[*].

[*] Fenomenul a fost descoperit de H. Temin şi D. Baltimore (1970). Ei au tratat celulele infectate cu VSR, cu *actinomicina D*, un antibiotic care se inseră între bazele moleculei de ADN dc şi inhibă transcrierea. Antibioticul inhibă multiplicarea virusurilor ADN, nu influenţează multiplicarea ribovirusurilor obişnuite, dar inhibă multiplicarea retravirusurilor. Concluzia a fost că în ciclul lor de multiplicare există o fază sensibilă la actinomicina D, reprezentată de un intermediar ADN.

Singura funcţie a ARN genomic este de a îndeplini rolul de matriţă pentru sinteza intermediarului de ADN în celula infectată. Celula nu posedă o enzimă care să îndeplinească această funcţie. Virionul conţine o ADN-polimerază dependentă de ARN, denumită *revers-transcriptază* (RT), precum şi molecule de ARNt încorporate din celulă în procesul asamblării, care îndeplinesc rolul de *primer* al transcrierii inverse, deoarece ADN-polimeraza nu iniţiază sinteza unei catene noi, ci doar alungeşte una preexistentă (fig. 386).

Procesul transcrierii începe timpuriu, deoarece RT se activează imediat ce virusul a ajuns în celula sensibilă. Etapele replicării ARN viral sunt următoarele:

a) Legarea complexului molecular al RT, de ARN genomic viral;

b) Sinteza unei copii de ADN complementar, catalizată de RT, care rămâne legată prin punţi de H, de ARN genomic. Rezultă un hibrid molecular ARN-ADN;

c) Digestia selectivă a ARN genomic, din hibrizii moleculari ARN-ADN, sub acţiunea RN-azei H, sau chiar sub acţiunea RT;

d) Sinteza unei catene complementare de ADN viral. Astfel se formează o moleculă dublu catenară de ADN viral, care este translocată în nucleul celulei infectate şi se *integrează* covalent în structura unui cromosom al celulei. ADN viral este integrat stabil şi din punct de vedere structural nu se distinge de secvenţele de ADN cromosomal.

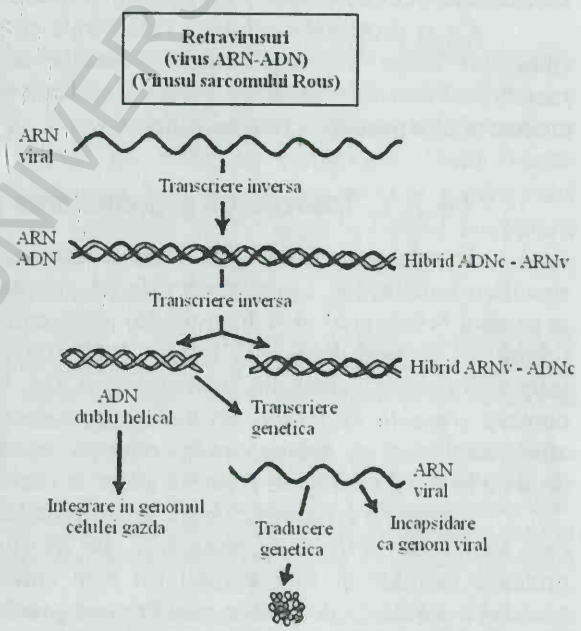


Fig. 386. Succesiunea etapelor transcrierii şi traducerii informaţiei genetice la retravirusuri.

ADN integrat este transcris în două tipuri de molecule de ARN: unele *scurte* (subgenomice), cu rol de ARNm şi altele *lungi*, cu funcţie genomică. La retravirusurile transductoare, copiile lungi de ARN încorporează secvenţe *oncogene* (protooncogene), derivate din celula gazdă.

Activitatea ADN-polimerazică a RT necesită o matriţă de ARN sau ADN şi, ca toate ADN-polimerazele cunoscute, nu iniţiază sinteza ADN *de novo*, ci necesită o moleculă preexistentă (primer). In *vitro*, primerul poate fi ARN sau ADN, dar *în vivo*, totdeauna este ARN.

Pentru sinteza catenei ADN de polaritate negativă, rolul de primer îl are molecula de ARNt, originară în celulă. Pentru sinteza celei de a II-a catene de ADN, molecula de ARN genomic este incizată la nivelul secvenţei polipurinice (PP) şi funcţionează ca primer.

Toate revers-transcriptazele, pentru activitatea *in vitro* au nevoie absolută de cationi bivalenţi: Mg^{2+} (10 mM).

Activitatea RN-azei H este inerentă în toate preparatele de revers-transcriptază. Ea hidrolizează ARN-genomic din hibridul ARN-ADN, pe măsura progresiei sintezei celei de a II-a catene de ADN.

18.7. Biosinteza proteinelor tardive

Categoria proteinelor tardive cuprinde pe acelea care se sintetizează după replicarea genomului viral. Ele sunt în primul rând, *proteine structurale,* necesare asamblării virionilor progeni şi se sintetizează cu o rată înaltă, prin transcrierea şi traducerea copiilor genomice multiple, rezultate prin replicare. De aceea, proteinele tardive se sintetizează în cantităţi mari, uşor detectabile pe imaginile electrono-optice sau la analiza electroforetică. De exemplu, în celulele infectate cu adenovirusuri, proteinele tardive se sintetizează în mare exces şi formează incluziuni mari, în care agregatele moleculare au o distribuţie ordonată, paracristalină. Alte proteine tardive au *rol funcţional*:

- *proteinele reglatoare*, al căror rol s-a demonstrat mai întâi pentru bacteriofagi, iar ulterior, pentru adeno- şi herpesvirusuri. Cantităţile de proteine necesare asamblării diferitelor structuri virale sunt foarte diferite şi proporţiile sintezei trebuie corelate direct cu necesarul;
- *proteine de morfogeneză*, necesare asamblării virusurilor cu structură complexă;
- proteine care uşurează *eliberarea* virionilor din celulă.

Pentru sinteza proteinelor tardive, virusurile folosesc aparatul celular de sinteză şi exploatează mecanismele celulare pentru transportul şi modificarea proteinelor traduse.

Ca şi proteinele celulare, cele virale se sintetizează pe ribosomii legaţi de membrane sau pe ribosomii liberi în citoplasmă, în funcţie de destinaţie. In celula normală, ribosomii asociaţi membranelor, sintetizează proteine şi glicoproteine de membrană, iar ribosomii liberi sintetizează enzime şi alte proteine citoplasmatice.

18.7.1. Transportul şi prelucrarea proteinelor

În celula eucariotă, proteinele şi acizii nucleici sunt transportaţi de la locul sintezei, la sediile specifice funcţiei lor. Localizarea diferită a proteinelor este determinată de secvenţa de aminoacizi de la capătul N-terminal al polipeptidului, denumită *secvenţa semnal*, dar şi de alte secvenţe ale polipeptidului, ca şi modificările ce survin după sinteză. Toate orientează proteina spre diferite localizări: intrarea în nucleu, inserţia în membrană etc. Determinanţii care orientează destinaţia proteinei se numesc *semnale de triere*. Semnalele au caracter de specificitate şi constau din scurte secvenţe de aminoacizi care se adaugă polipeptidului în cisternele aparatului Golgi. In funcţie de destinaţie, proteinele vor fi segregate şi împachetate în vezicule separate.

Adeseori, proteinele virale se sintetizează sub forma unor precursori de dimensiuni mai mari, care sunt supuşi *clivajului* proteolitic, fie în timpul sintezei, fie ulterior. Clivările sunt catalizate de proteaze celulare şi mecanismul lor este similar cu acela al clivării proteinelor celulare. Astfel, proteinele virale cu destinaţie membranară pierd secvenţa N-terminală, înainte de terminarea sintezei. Proteinele structurale sunt, adeseori, clivate în timpul asamblării virionilor.

Glicozilarea proteinelor virale, consecutivă traducerii informaţiei genetice urmează acelaşi mecanism ca şi glicozilarea proteinelor celulare. Toate proteinele expuse pe suprafaţa învelişului sunt glicozilate, iar cele din structura nucleocapsidei nu sunt niciodată glicozilate. Catenele glucidice ale glicoproteinelor virale şi celulare, formate din 1–3 resturi, sunt *N-lincate* (C1 glucidic se leagă de NH_2 al restului de Asp printr-o legătură N-glicozidică) şi conţin secvenţa Man-GlcNac-GlcNac. Glicozilarea începe în timpul sintezei polipeptidului în *reticulul endoplasmic*.

Catenele glucidice *O-lincate* sunt legate prin intermediul C_1, de treonină şi serină, şi sunt adăugate totdeauna în *cisternele Golgi*. Diferitele zaharuri ale catenei oligozaharidice sunt adăugate secvenţial, fiecare reacţie fiind catalizată de o *glicozil-transferază* specifică de origine celulară.

Unele proteine virale sunt *fosforilate*. Ele interacţionează cu ADN şi au rol în replicarea ADN sau în transcriere. Altele sunt *acilate,* prin legarea covalentă a acizilor graşi.

Proteinele virale tardive sunt transportate la situsuri diferite în funcţie de sediul morfogenezei virionilor: o parte rămâne în celulă, iar o altă parte este transportată la nivelul membranei, având rol în procesul înmuguririi virale.

Glicoproteinele peplosului virusului gripal se sintetizează pe ribosomii asociaţi RE, sunt translocate în lumenul RE printr-un por proteic (translocon) şi intră în calea secretorie a celulei: migrează în cisternele golgiene şi se glicozilează sau suferă alte modificări (acilare cu acid palmitic sau miristic). Prin vezicule de transport, glicoproteinele sunt transportate la nivelul membranei şi se inseră pe faţa externă a acesteia. Proteina matriceală (M), neglicozilată, se agregă prin interacţiuni necovalente, pe faţa internă a membranei citoplasmatice, în zone distincte ("petice").

18.8. Asamblarea (morfogeneza) şi eliberarea virionilor

Studiul dinamicii asamblării virusurilor infecţioase pentru celula animală este îngreunat, pe de o parte, de complexitatea structurală a capsidei, iar pe de altă, de abundenţa componentelor moleculare ale mediului celular în care are loc asamblarea. Cunoştiinţele referitoare la mecanismele dominante ale asamblării virale sunt rezultatul studiilor morfogenezei fagilor şi a virusurilor infecţioase pentru plante.

Morfogeneza virală se supune principiului fundamental al *autoasamblării*[*], ca rezultat al faptului că fiind determinante de formă, capsomerele se pot asocia într-o modalitate unică.

[*] Autoasamblarea semnifică faptul că toată energia şi informaţia pentru asamblare sunt conţinute în monomerii individuali. Monomerii se asociază unul cu altul, într-o ordine determinată, într-o combinaţie de legături ionice, legături de H şi interacţiuni hidrofobe.

La virusurile cu simetrie helicală (de exemplu, virusul mozaicului tutunului – VMT), capsida se asamblează pe măsură ce capsomerele interacţionează cu ARN genomic. La acest virus s-a demonstrat pentru prima dată, existenţa unei relaţii fixe între genom şi capsomere, precum şi mecanismul autoasamblării. Genomul VMT este alcătuit din 6390 de nucleotide. Dacă fiecare capsomeră, în procesul morfogenezei capsidei se asociază cu trei nucleotide, rezultă că lungimea genomului viral, determină în mod obligatoriu, lungimea virionului. Altfel spus, în timpul asamblării virionului, capsomerele se aşează în jurul moleculei de ARN genomic. In absenţa genomului, capsomerele se asamblează în număr foarte mare, formând o capsidă imensă, dar goală.

La VMT, molecula proteică este în acelaşi timp, unitate chimică şi unitate structurală a capsidei (capsomera). In anumite condiţii de mediu (creşterea valorii pH), capsida se dezorganizează în capsomerele componente. Restabilirea condiţiilor de mediu, induce autoasamblarea capsidei cilindrice, deoarece capsomerele sunt determinante de formă, adică se pot asambla într-un singur mod, după principiul de construcţie a simetriei helicale.

Mecanismul autoasamblării capsidei VMT este următorul: iniţial se formează un complex stabil, de 17 unităţi proteice (capsomere), în formă de disc, aşezate într-un *strat unic*. Ele se agregă spontan pentru a forma un disc alcătuit din două straturi ce conţin 34 capsomere. Fiecare strat al discului conţine 17 capsomere, aproape acelaşi cu numărul de capsomere (16,3), într-un tur al helixului VMT. Discul alcătuit din *două straturi* de capsomere este intermediarul cheie al asamblării VMT. O proprietate importantă a discului este că subunităţile pot să alunece una faţă de altă, pentru a forma un helix cu două tururi.

Discul, alcătuit din două tururi de capsomere, interacţionează cu ARN genomic. Asamblarea începe prin inserţia buclei de iniţiere a genomului (secvenţa de împachetare), în spaţiul liber din centrul discului proteic. Discul proteic recunoaşte specific secvenţa de împachetare a genomului. Cu excepţia secvenţei de împachetare, care iniţiază procesul asamblării, proteinele capsidei şi ARN genomic interacţionează nespecific. Prin interacţiunea lor, nu se formează legături covalente noi, ci numai legături secundare slabe. Ca dovadă a interacţiunii laxe, atât între capsomere, cât şi între capsomere şi ARN, capsida se disociază prin creşterea valorii pH.

Virionul este complet asamblat după ce este acoperit capătul 5' al genomului.

În general, virionii cu *structură complexă* se asamblează gradat din ansambluri distincte, construite din subunităţi proteice, ce se formează spontan prin autoasamblarea moleculelor proteice individuale.

În esenţă, asamblarea virionilor cu simetrie icozaedrică, este rezultatul a două procese ce se desfăşoară succesiv sau aproape simultan:

– *asamblarea proteinelor* structurale în *capsomere* şi a acestora în *structura capsidei*. La virusurile complexe, capsomera ca unitate de construcţie este alcătuită din câteva molecule proteice;

– *asocierea capsidei cu acidul nucleic* genomic. Poate fi asamblată o structură capsidală goală, în care ulterior pătrunde ADN sau împachetarea ADN este concomitentă cu asamblarea capsidei.

La *ribovirusurile nude, cu simetrie icozaedrică*, asamblarea capsidei şi asocierea ei cu ARN sunt procese aproape concomitente, datorită instabilităţii ARN viral în celulă.

La *virusurile ADN cu simetrie icozaedrică* (adeno-, herpetice), ansamblurile proteice pot forma o structură goală, matură, denumită *precapsidă*, înainte de a se asocia cu genomul. Interacţiunea genomului viral (ADN sau ARN), cu proteinele capsidale şi rolul acestor interacţiuni în împachetarea genomului rămân necunoscute. În capsidă este împachetat, de regulă, numai ARN genomic, ca dovadă a existenţei unei secvenţe de împachetare (identificată la ARN Sindbis – un alfavirus).

În procesul asamblării capsidelor cu simetrie icozaedrică, participă proteinele de "cofraj". Ele au probabil, nu numai un rol *mecanic*, ci şi *catalitic* în realizarea unor interacţiuni stabile ale moleculelor componente. După asamblarea capsidei şi consolidarea interacţiunilor între capsomere, proteinele de "cofraj" sunt eliminate din structura virionului.

La reovirusuri, segmentele genomice de ARN dublu catenar se asamblează cu o proteină de morfogeneză şi formează regiunea centrală a virionului, pe suprafaţa căreia se asamblează capsida.

Virusurile, dar în special cele învelite (HIV, pox-, herpesvirusuri), au un mare potenţial de a îngloba proteine ale celulei gazdă, atât în peplos, cât şi în structurile subiacente, dar nu li se cunoaşte semnificaţia funcţională.

Studiul ultrastructural al multiplicării *virusului vaccinal* a relevat procesul stadial complex al morfogenezei, cu participarea cisternelor aparatului Golgi, care formează învelişul extern al virionilor. În citoplasma celulelor infectate apar zone difuze sau bine delimitate alcătuite din material fin-granular, denumite *viroplasmă*, în interiorul cărora se asamblează virionii progeni. Procesul asamblării, complex şi incomplet elucidat, comportă edificarea *de novo* a unor structuri *membranare* destinate să înglobeze o parte din materialele viroplasmei.

Creşterea, turnover-ul şi repararea membranelor se face prin intercalarea componentelor structurale (proteine, lipide) în structurile preexistente. Biogeneza *de novo* a membranelor rămâne una dintre marile probleme ale biologiei. Pentru virusurile pox, există dovada structurală că unele componente ale învelişului, sintetizate sub control viral, încep să se condenseze în membrane. Membranele sunt asamblate în focare viroplasmice discrete şi rămân separate de membranele celulare.

Membranele virale sintetizate *de novo* sunt detectabile în matricea viroplasmei şi au structură trilaminară, fiind tapetate la exterior de un strat dens de spiculi. Pe măsură ce membranele cresc, ele înconjură ADN nascent şi proteinele acumulate în viroplasmă.

Eliberarea virionilor din celulă se face prin mai multe mecanisme, dependente în primul rând, de natura virusului.

Virusurile nude se eliberează rapid după *moartea şi liza celulei*. Într-o mică măsură, virusurile nude (cu genom ARN sau ADN) se eliberează prin modificarea permeabilităţii membranei citoplasmatice.

Majoritatea virusurilor *învelite* (mixo-, paramixo, toga-, retravirusuri) se eliberează prin *înmugurire* din membrana citoplasmatică sau în cisternele RE granular (flavivirusuri), în cisternele Golgi sau în membrana nucleară. Ultimele etape ale asamblării nucleocapsidei sunt asociate cu primele stadii ale înmuguririi, sau asamblarea capsidei precede înmugurirea (de exemplu, particulele de tip B şi D ale retravirusurilor). Inmugurirea are loc la nivelul unor situsuri specifice ale membranei celulare, acolo unde proteinele virale s-au inserat, atât pe faţa internă cât şi pe cea externă a membranei plasmatice sau a membranelor reticulului endoplasmic. Asamblarea prin înmugurire necesită co-localizarea componentelor structurale (fig. 387). Virusurile care înmuguresc prin membrana plasmatică conţin fosfolipide şi colesterol în proporţii caracteristice membranei, iar cele care înmuguresc în cisternele RE au colesterol în proporţie foarte mică.

Proteinele care proemină pe suprafaţa externă a membranei sau în cisternele reticulului endoplasmic, sunt glicozilate, iar cele care tapetează faţa internă a membranei citoplasmatice sunt neglicozilate. Glicoproteinele virale se inseră în zone distincte ale membranei, din care proteinele celulare sunt dislocate sau chiar înlocuite. Nucleocapsidele se asociază specific cu proteinele virale care tapetează faţa citoplasmatică a membranei (proteina M), sau cu domeniile citoplasmatice ale glicoproteinelor virale inserate în membrană (la togavirusuri).

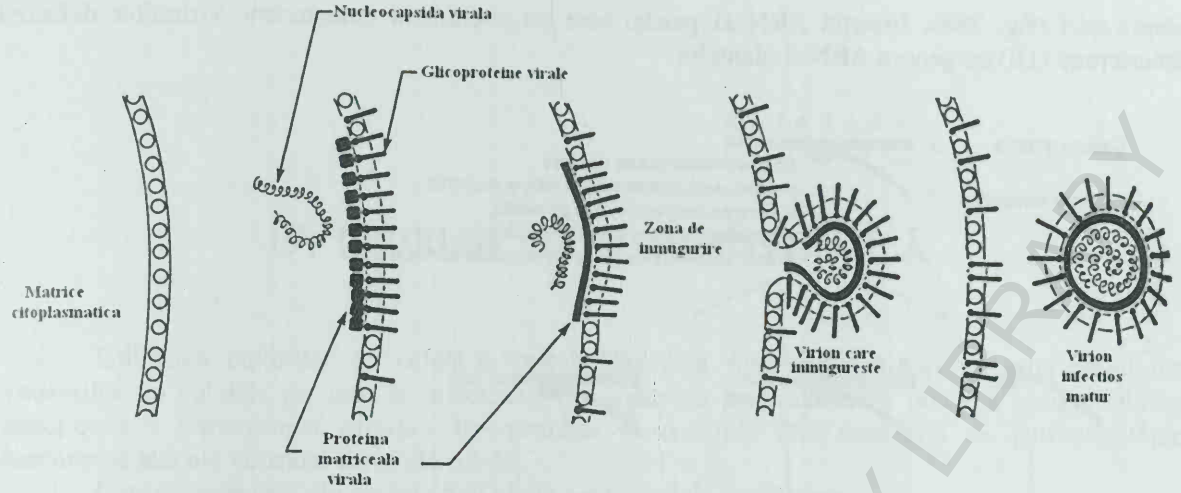


Fig. 387. Formarea învelişului viral prin înmugurire şi eliberarea virionilor progeni.

La ortho- şi paramixovirusuri, nucleocapsidele recunosc specific şi se ataşează de proteina matriceală. Ulterior începe înmugurirea şi treptat, virionul se eliberează, învelit fiind de membrana citoplasmatică, în care se găsesc inclavate glicoproteinele virale. Proteina matriceală are rolul unei punţi de legătură între nucleocapsida virală şi glicoproteinele inserate în membrană.

Lipidele şi glucidele din alcătuirea învelişului viral sunt proprii celulei. Din această cauză, compoziţia lor în structura unui virus diferă în raport cu substratul celular în care se multiplică. Datorită acestui fapt, preparatele unui virus, obţinute pe linii celulare diferite se deosebesc prin proprietăţile fizice, biologice şi antigenice.

Unele virusuri care înmuguresc, nu sunt foarte eficiente în procesul eliminării proteinelor membranare, iar fenomenul încorporării proteinelor membranare este real. De aceea, învelişul viral conţine şi glicoproteine de origine celulară şi chiar ale unui alt virus, care infectează concomitent aceiaşi celulă. Faptul este ilustrat de neutralizarea retravirusurilor, atât *in vivo* cât şi *in vitro*, de anticorpii specifici faţă de proteinele membranare. Proteinele membranare par a fi încorporate pasiv în înveliş, dacă nu împiedică steric formarea acestuia.

Eliberarea virionilor prin înmugurire este mai eficientă pentru randamentul infecţiei (producerea virusului progen), deoarece nu depinde de dezintegrarea imediată a celulei. Celula rămâne viabilă o perioadă mai lungă de timp sau după transformarea malignă este chiar nemuritoare şi eliberează virus.

Efectele virusurilor care înmuguresc, asupra celulei gazdă sunt foarte diverse: de la citoliză (toga-, paramixo, rhabdovirusuri), până la supravieţuirea nelimitată a acesteia, după transformarea cu retravirusuri.

La herpesvirusuri, virionii se învelesc la contactul cu lamela internă a membranei nucleare, traversează spaţiul dintre cele două lamele şi la nivelul porilor nucleari trec în cisternele reticulului endoplasmic şi în vezicule. Sistemele membranare închise protejează virionii de contactul cu citoplasma şi mediază transportul la suprafaţa celulei. Membrana veziculei de transport, fuzionează cu membrana citoplasmatică şi virionii sunt eliberaţi în spaţiul extracelular. Herpesvirusurile sunt totdeauna citolitice.

Celulele infectate cu virusuri care înmuguresc la nivelul membranei citoplasmatice sau la nivelul altor membrane celulare, devin ţinta antigenică pentru efectorii sistemului imunitar, care recunosc glicoproteinele codificate de virus. Cele infectate cu virusuri nude sunt recunoscute de efectorii sistemului imunitar, deoarece expun antigene virale asociate cu molecule membranare.

Particulele virale defective diferă de virionii standard, pentru că le lipseşte o parte a informaţiei genetice. Ele sunt rezultatul replicării genomului printr-un mecanism în care polimeraza se opreşte sau alunecă şi reiniţiază sinteza la un situs nou. In funcţie de direcţia reiniţierii, moleculele genomice rezultate pot fi de tipul *copierii inverse* (copy-back), de tipul *deleţiei interne* şi de tipul

duplicației (fig. 388). Inserția ARN al gazdei este un eveniment caracteristic virionilor defectivi interferenți (DI) cu genom ARN ai plantelor.

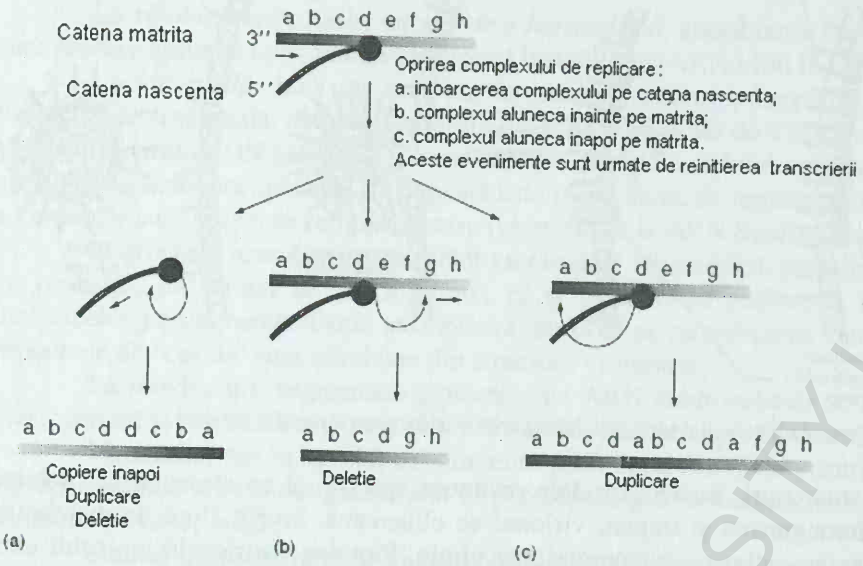


Fig. 388. Mecanismele genetice ale generării particulelor virale defective (după L. Roux, 2008).

Genomul virionilor DI are ORF întrerupte sau rearanjate şi nu codifică toate proteinele care condiționează dsfăşurarea ciclului de multiplicare. In consecință, virionii defectivi sunt dependenți de funcțiile pe care le oferă un virus omlog standard. Co-infecția celulelor cu virioni DI şi standard este esențială pentru multiplicarea DI. Generarea virionilor DI este un eveniment rar, dar este favorizat de infecția substratului celular cu un inocul la multiplicitate înaltă.

Bibliografie

Holland J. J. 1990. Defective Viral Genomes în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Pringle C. R. 1990. The Genetics of Viruses, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Pennington T. H. 1998. The Replication of Viruses, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Roizman B. 1991. *Multiplication of Viruses*, în vol. Fundamental Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Garoff H., Hewson R., Opstelten E.D.J. 1998. Virus Maturation by Budding. Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 62, no. 4 :1171–1190.

Ramig R. F. 1990. Principles of Animal Virus Genetics, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Wiley D. C., Skehel J. J. 1991. Viral Membranes, în vol. Fundamental Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Roizman R. 1996. Multiplication of Viruses, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Norkin L. C. 1995. Virus Receptors: Implications for Pathogenesis and the Design of Antiviral Agents. Clin. Micr. Rev., vol. 8, no. 2 : 293–315.

Dougherty W. G., Semler B. L. 1993. Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes – Microbiol. Rev., 57(4): 781–822.

Maxwell K. L., Frappier L. 2007. Viral proteomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol.71, 2 : 398–411.

Roux L. 2008. Defective Interfering Viruses, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Leppard K. N. 2008. Adenoviruses, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Creighton T. C. 1999. Encyclopedia of Molecular Biology, 1999, John Wiley & Sons, Inc.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

19. TIPURI DE RELAŢII VIRUS-CELULĂ

Utilizarea culturilor de celule a permis definirea mai multor tipuri de interacţiuni ale virusurilor cu celulele pe care le infectează, dominate de particularitatea unică a acestor entităţi infecţioase – *parazitismul absolut*. Interacţiunea virus-celulă este modulată de particularităţile funcţionale atât ale virusului cât şi ale celulei.

Consecinţele posibile ale infecţiei virale pentru celula gazdă sunt:

- infecţia citocidă;
- infecţia necitocidă (persistentă);
- infecţia latentă, caz în care genomul persistă în celulă, dar nu se replică, nu se asamblează virus progen. Celula nu este lizată. Această formă de infecţie caracterizează adenovirusurile şi în special virusurile herpetice, care pot rămâne latente pentru perioade lungi;
- transformarea malignă.

După ce un virus infectează celula sensibilă, ansamblul rezultat constituie o unitate funcţională cu trăsături noi, distincte, care nu este suma aritmetică a celor două unităţi (celulă şi virus), ci un *complex viu,* a cărui funcţionalitate derivă din interacţiunea celor două genomuri. Uneori, genomul viral domină funcţionalitatea complexului, iar alteori informaţia genetică virală este dominată de programul genetic al celulei.

Modalităţile de evoluţie a complexului virus-celulă sunt următoarele:

- evoluţia (starea) *independentă*;
- evoluţia (starea) *dependentă* (sau interacţiunea de tip integrativ).

Starea independentă a celor două unităţi care interacţionează corespunde situaţiei în care genomul viral nu se supune mecanismelor reglatoare ale celulei. Multiplicarea virusului se realizează într-un ritm propriu, coordonat de genomul viral. Rezultatul interacţiunii este *infecţia virală productivă.*

Infecţia productivă defineşte interacţiunea în cursul căreia virusul infectant preia controlul proceselor de biosinteză celulară şi le deviază de la sinteza constituienţilor proprii, în sensul biosintezei mai mult sau mai puţin exclusivă, a constituienţilor virali. Informaţia genetică virală este exprimată integral, asigurând desfăşurarea întregului ciclu de multiplicare, asamblarea virionilor şi, în multe cazuri, moartea şi liza celulei cu eliberarea virusului progen (efect citocid).

Celulele care permit exprimarea integrală a mesajului genetic, multiplicarea şi eliberarea virusului sunt *permisive*. Permisivitatea este o proprietate datorată structurii lor genetice. Celulele permisive provin, de regulă, de la speciile pe care virusul le infectează în mod natural, deşi există numeroase excepţii (de exemplu, ortho- şi paramixovirusurile se multiplică în oul embrionat de găină). Caracterul "permisiv" şi respectiv "nepermisiv" este, cel puţin uneori, controlat genetic şi este influenţat de gradul de *diferenţiere* celulară. Celulele embrionare sunt mai permisive. Celulele *semipermisive* permit multiplicarea virală, dar cu o rată mai mică. Degenerarea celulei şi liza, dacă se produc, apar într-un interval mai îndelungat decât al celulei permisive.

Starea independentă a genomului viral faţă de celulă se poate manifesta sub două forme:

a) a sistemului independent citocid;

b) a sistemului independent echilibrat, care corespunde unei evoluţii moderate a interacţiunii.

Sistemul independent citocid corespunde relaţiei în care genomul viral se replică foarte activ. Celula este copleşită de rata înaltă a biosintezei componentelor virale şi de asamblarea virionilor

progeni. Rezultatul este dezintegrarea celulei şi eliberarea virionilor progeni. Această interacțiune corespunde *infecției litice productive.*

Sistemul independent echilibrat caracterizează complexele furnizate de unele virusuri moderate, care persistă în celulă, dar nu inhibă biosintezele celulare. Genomul viral se replică autonom, dar cu o rată scăzută, care asigură *persistența* lui în celulă şi transmiterea de la o generație celulară la altă. Se sintetizează macromolecule virale şi se asamblează virioni progeni. Caracteristic este faptul că genomul viral se păstrează în celulă, în stare *fizic independentă*, ca ADN episomal. Virusul determină o infecție de lungă durată (infecție *persistentă*) sau o *infecție latentă*, în cursul căreia genomul viral, fizic autonom, persistă în celulă, dar nu se replică, iar celula rămâne viabilă.

Infecțiile *persistente* sunt produse de virusuri care se multiplică fără să producă modificări profunde ale metabolismului celular. Inițial, infecțiile persistente au fost recunoscute numai *in vivo*, dar persistența virală se produce şi *in vitro*. In culturile celulare se recunosc două tipuri de infecții persistente:

1) *Infecțiile echilibrate cronice* ("steady state infections", *steady*, lb. engleză = stabil) corespund situației în care, toate sau aproape *toate celulele* dintr-o cultură sunt infectate cu un *virus necitocid*, care este produs continuu, uneori foarte intens. Celulele rămân viabile, metabolic active şi continuă să se dividă, iar virusul este transmis celulelor fiice. Disfuncțiile celulei, deşi inițial sunt minore, pot duce în timp, la tulburări severe. Acest tip de infecție a fost evidențiat în celulele renale de maimuță, aparent normale, contaminate cu SV_{40} sau cu SV_5 (un paramixovirus). In culturile de celule renale, SV_{40} se multiplică, dar celulele rămân viabile, eliberând cantități mari de virus în mediul extracelular.

Infecția echilibrată, *in vitro* nu poate fi eliminată prin adăugarea anticorpilor neutralizanți, deoarece nu există o fază de infecție exogenă.

2) *Starea de purtător* ("carrier state") se datorează infecției produse de un *virus citocid*, a cărui multiplicare este limitată la *un număr restrâns de celule permisive*, dar majoritatea celulelor substratului sunt nepermisive. Persistența infecției este asigurată de transmiterea virusului progen la un număr mic de celule permisive ale culturii. Majoritatea celulelor culturii sunt nepermisive, datorită unor fenomene de rezistență intrinsecă sau datorită unor factori inhibitori (anticorpi, interferon) prezenți în mediu. Spre deosebire de infecția cronică echilibrată, starea de purtător de virus a unei culturi celulare poate fi "vindecată" (deoarece infecția este exogenă), prin adăugarea anticorpilor antivirali neutralizanți sau prin clonarea suspensiei celulare, la o densitate suficient de mică, pentru a permite izolarea celulelor individuale indemne.

Evoluția dependentă sau interacțiunea de tip integrativ a fost recunoscută inițial, pentru interacțiunea fagului λ cu celulele de *Escherichia coli* K_{12}. Genomul viral se integrează în cromosomul bacterian, ca profag (provirus) şi persistă nu numai în celula infectată, ci se transmite descendenților ei.

Interacțiunea de tip integrativ caracterizează raportul dintre genomul virusurilor oncogene şi celulele animale. Uneori, rezultatul interacțiunii de tip integrativ este *transformarea malignă* (efect citochinetic) a celulei, consecință directă a modificărilor profunde a funcțiilor celulare. Celulele transformate malign pot să producă virus progen (transformare productivă), dar în alte cazuri, producerea virusului progen nu este detectabilă. Alteori, interacțiunea de tip integrativ nu are ca efect transformarea malignă, ci constituie mecanismul molecular obligatoriu al multiplicării virale (de exemplu, pentru retravirusurile neoncogene).

În concluzie, tipurile de interacțiuni dintre un virus şi un substrat celular sunt dependente atât de originea substratului celular, de stadiul fiziologic al celulelor, dar şi de virusul infectant.

19.1. Patologia celulelor infectate cu virusuri

De cele mai multe ori, într-un substrat celular *permisiv,* multiplicarea virusurilor interferă cu funcțiile normale ale celulei gazdă şi produce modificări cu atât mai ample, cu cât gradul de sensibilitate a celulei este mai mare, mergând până la degenerare şi moarte. În celulele infectate cu virusuri, se acumulează componente virale care determină apariția modificărilor structurale, biochimice şi funcționale, consecința fiind liza celulei.

Frecvent, termenul de *efect citopatogen* este folosit în sens strict pentru a descrie exclusiv leziunile morfologice, deoarece sunt mai uşor de evidenţiat. Modificările morfologice sunt expresia celor metabolice, deşi intensitatea lor nu este totdeauna corelată direct.

Orice tip de modificare celulară indusă de virus, fie că are o expresie *morfologică,* fie numai una *biochimică* poartă denumirea de *efect citopatogen* sau *citopatic (ECP).* Noţiunea include atât efectul litic, cât şi toate celelalte modificări compatibile cu supravieţuirea.

Din punct de vedere funcţional, cele mai evidente ECP sunt de tip *citocid, citochinetic sau citotoxic.*

Infecţia de tip *citocid* induce modificări *morfologice* ce constau în schimbări ale aspectului celular: a) *constricţia* – celulele devin mai mici, se rotunjesc, iar citoplasma are aspect granular; b) *creşterea volumului celular*, creşterea refringenţei şi tendinţa de agregare; c)*vacuolizarea citoplasmei* (indusă de virusurile vacuolante tip SV_{40}), precum şi alterări nucleare sau citoplasmatice, cu diferite grade de intensitate; d)*fuziunea şi formarea sinciţiilor* sunt modificări frecvente induse în special de virusurile învelite; e)apariţia *corpilor de incluzie.*

Efectul *citocid* este rezultatul infecţiei celulelor sensibile cu virusuri citolitice şi se datorează leziunilor progresive, care duc la alterarea profundă a activităţilor metabolice şi a unor structuri celulare determinând, în fazele tardive ale ciclului infecţios, moartea celulei şi eliberarea virionilor. Celulele cultivate în monostrat se desprind de suport şi manifestă alterări majore: rotunjire, vacuolizare, ratatinare (constricţie celulară), pierderea afinităţii pentru coloranţii vitali (albastru tripan, roşu neutru), ceea ce permite identificarea şi diferenţierea lor de celulele vii.

Efectul citocid şi de distrugere litică a celulelor infectate cu virus se exteriorizează macroscopic, în culturi celulare în monostrat, prin apariţia *discontinuităţilor pânzei celulare*, denumite *plaje de liză.* Ele apar ca nişte *zone clare* în mijlocul unui strat confluent de celule învecinate, de obicei ca rezultat al multiplicării în cicluri succesive, a unei singure particule virale din inoculul iniţial. Forma şi mărimea plajelor pot furniza date utile pentru identificarea virusului. Virusurile care nu lizează celula gazdă, nu produc plaje de liză.

Virusurile oncogene stimulează rata diviziunii celulelor, denumit efect *citochinetic,* de cele mai multe ori ca rezultat al transformării maligne, produsă de retravirusurile oncogene şi de dezoxiribovirusuri. Ultimele transformă numai substratul celular *nepermisiv,* cu o frecvenţă redusă.

Efectele citopatogene au, adeseori, un caracter specific şi se însoţesc de apariţia unor modificări caracteristice ce pot fi utilizate pentru a preciza natura virusului infectant.

Efectul *citotoxic* hiperacut este cauza morţii celulare, înainte de multiplicarea virală, fără producerea virusului progen. Moartea celulară este rezultatul unui *efect toxic al proteinelor virale*, consecutiv infecţiei experimentale a culturilor celulare cu un inocul masiv. Efectul toxic este produs de proteina pentonică a adenovirusurilor.

19.2. Mecanismele moleculare ale efectului citopatic

ECP este consecinţa parazitismului absolut al virusurilor, a eficienţei lor de a subordona activitatea metabolică a celulei şi de a o orienta în sensul sintezei macromoleculelor cu specificitate virală. Bazele moleculare ale ECP sunt puţin cunoscute.

Virusurile inhibă mai *multe procese celulare* pentru că un singur mecanism de acţiune nu are eficienţă completă. Mecanismele ECP sunt specifice virusului infectant.

Într-un complex virus-celulă, predomină unul dintre mecanismele prezentate mai jos.

19.2.1. Modificări metabolice

Interacţiunea citolitică produce inhibiţia sintezei macromoleculelor specifice celulei, denumită şi 'efect de întrerupere' (shutoff). In absenţa sintezelor specifice, care să înlocuiască moleculele uzate, apar modificări funcţionale şi structurale incompatibile cu viaţa.

Virusurile controlează metabolismul celular prin mai multe mecanisme, care constau în:

- schimbări în metabolismul intermediar, în special al dezoxiribonucleotidelor;

– modificări ale sintezei, prelucrării, transportului şi turnover-ului macromoleculelor celulare;
– intensificarea exprimării genelor virale şi interferenţa cu programul celular.

De regulă, virusul nu omoară celula înainte de desfăşurarea ciclului de multiplicare.

19.2.1.1. Modificări ale metabolismului acizilor nucleici celulari

Modificări ale ADN celular. Virusurile complexe (adeno, herpes) *modifică starea fizică a ADN celular*, făcând-o incompatibilă cu replicarea şi cu funcţia de transcriere, ceea ce determină inhibiţia sintezei macromoleculelor specifice celulei. Matricea nucleară este suportul fizic pentru cromatină, dar şi pentru procesele de transcriere şi replicare a ADN.

Unele *molecule virale* se asociază cu matricea nucleară şi modifică distribuţia ADN în nucleu. De exemplu, în celulele infectate cu *virusuri herpetice*, ADN se desprinde din punctele de inserţie pe matricea nucleară, iar după infecţia cu *adenovirusuri*, efectul este invers, de *marginaţie* a cromatinei (deplasarea şi aglomerarea ei spre periferia nucleului, în blocuri heterocromatice). *Virusurile pox codifică o DN-ază*, ce pătrunde în nucleul celulei şi depolimerizează ADN monocatenar, despiralizat pentru replicare sau pentru transcriere. Replicarea genomului viral (ADN sau ARN) este dependentă de rezerva de nucleotide a celulei, deoarece acizii nucleici ai celulei nu sunt degradaţi. Retravirusurile se integrează în cromosomii celulei şi stimulează rata diviziunii celulare, dar nu interferă cu replicarea ADN celular. Replicarea ADN celular are loc în faza S a ciclului şi necesită dezoxiribonucleotide, enzime de replicare şi sinteză proteică.

Dezoxiribovirusurile se multiplică în diferite tipuri de celule, chiar în cele diferenţiate terminal (de exemplu, neuroni), în care sinteza ADN şi diviziunea încetează. Ele posedă mecanisme prin care depăşesc condiţiile restrictive ale cantităţii limitate de dezoxiribonucleotid-trifosfaţi (dNTP).

Uneori, chiar celulele care se divid nu pot oferi cantităţile de dNTP impuse de sinteza ADN viral, ceea ce necesită un aport suplimentar.

Disponibilitatea limitată a dNTP este depăşită prin două mecanisme:

– virusurile cu genom mic (papova) induc *intrarea celulei în faza S.* Se exprimă genele celulare pentru sinteza enzimelor ce catalizează sinteza dNTP şi replicarea ADN. Antigenul T de 94 kDa codificat de SV_{40} se leagă de o proteină supresoare a diviziunii celulare şi a replicării ADN – proteina p53 – şi astfel se anulează efectul său inhibitor. Exprimarea unei singure gene virale pregăteşte celula pentru replicarea ADN. *Activarea genelor reglatoare ale diviziunii, stă la baza potenţialului oncogen al acestor virusuri;*

– *virusurile cu genom mare* (adeno, herpes, pox), suplimentează cantitatea de dNTP deoarece *codifică propriile enzime* ale metabolismului nucleotidelor şi ale replicării ADN. Genele virale pentru aceste enzime au fost probabil dobândite din celulă. Ele nu funcţionează dacă virusul infectează celule metabolic active, dar conferă independenţa multiplicării virale de faza S a ciclului celular. Enzimele virale catalizează aceleaşi reacţii ca şi omologele lor celulare, dar specificitatea de substrat şi mecanismele de reglare sunt diferite, ceea ce le face ţinte pentru agenţii antivirali. De exemplu, acyclovir şi gancyclovir, analogi ai guanozinei, pot fi fosforilate de Tk a herpesvirusurilor şi încorporate în catena de ADN viral, dar nu de Tk a celulei;

– adenovirusurile codifică trei proteine pentru replicarea ADN: *o ADN-polimerază, o proteină legată terminal de genom cu rol de primer al sintezei ADN viral şi o proteină care se asociază cu ADN monocatenar.* Herpesvirusurile codifică 7 proteine cu rol în replicarea ADN, ceea ce le conferă independenţa de ciclul celular şi le permite să se multiplice după *inhibiţia sintezei ADN* şi chiar în celule care nu se divid (neuroni), unde produc infecţii persistente latente.

Ca răspuns la infecţia cu unele virusuri, celulele suferă fenomenul de *apoptoză*, în cursul căreia se produce *clivajul internucleosomal al cromatinei.* In general, virusurile inhibă programul apoptotic, celula rămânând viabilă ca substrat al multiplicării virale, iar altele (influenza, Sindbis) par a fi adaptate să se multiplice în celulele apoptotice.

Modificări ale metabolismului ARN celular. Pentru sinteza proteinelor virale, este totdeauna necesară sinteza ARNm cu specificitate virală. Perturbarea metabolismului celular se produce la toate

treptele: *transcriere, prelucrare, transportul nucleo-citoplasmatic, traducere, sau modificarea ratei degradării*. Toate conferă un avantaj competitiv ARN viral prin următoarele mecanisme:

– toate *ribovirusurile* şi *poxvirusurile* codifică sinteza unei *ARN-polimeraze* cu acţiune specifică faţă de genomul viral;

– *dezoxiribovirusurile* codifică în faza timpurie, sinteza cel puţin a unui *factor viral* care schimbă specificitatea ARN-pol II celulare şi o orientează spre ADN viral, trecând-o sub controlul unui *promotor viral* foarte activ;

– *majoritatea ribovirusurilor inhibă activitatea aparatului de transcriere* al celulei, deoarece se multiplică în citoplasmă şi nu necesită activitatea de transcriere a celulei. Unele proteine virale cu rol important în ciclul de multiplicare (de exemplu *proteaza 3C* a poliovirusului şi *proteina M* a VSV), *inhibă activitatea* celor 3 ARN-polimeraze celulare, blocând *transcrierea genelor* (Lyles, 2000). Proteinele ribovirusurilor sunt localizate, în cea mai mare parte în citoplasmă, dar proteaza 3C şi proteina M se găsesc şi în nucleul celulei infectate. In cele 2 sedii proteina M îndeplineşte funcţii distincte: în *ciclul multiplicării* are rol în asamblarea virionilor şi inducerea procesului de înmugurire, iar în nucleu *inhibă transcrierea* genelor celulare. Proteaza 3C a FMDV clivează histona H_3 şi inhibă transcrierea prin alterarea matriţei cromatiniene. *Excepţia o constituie virusurile influenza* care având o fază nucleară a ciclului, necesită activitatea de transcriere a celulei pentru producerea oligonucleotidelor bonetate pe care le folosesc ca primeri pentru sinteza ARNm viral;

– cele mai multe virusuri neoncogene inhibă *maturarea ARNm* celular prin mecanisme complexe. De exemplu, proteina NS_1 a virusului gripal inhibă maturarea ARNm celular, în 2 trepte: interferă cu *treapta de clivare a ARN premesager* şi inhibă *treapta adenilării capătului 3'*. Tot ea *clivează un fragment de 10–13 nucleotide* de la capătul 5' al ARNm celular. Fragmentele au rol de *primeri* pentru iniţierea sintezei ARNm viral în nucleul celulei infectate, dată fiind incapacitatea ARN-polimerazei virale de a iniţia sinteza moleculelor de ARN. Efectul este transferul secvenţei de bonetare de la ARNm celular la mesagerii virali, făcându-i nefuncţionali pe primii şi asigurând traducerea celor virali;

– la adenovirusuri, două proteine timpurii *inhibă transferul nucleo-citoplasmatic al ARNm celular din nucleu* şi favorizează transferul ARNm viral tardiv;

– virusurile herpetice şi virusul vaccinal *măresc rata degradării ARNm* şi inhibă sinteza proteinelor celulare. Creşterea ratei degradării nu este specifică ARNm celular, deoarece mesagerii virali sunt supuşi aceluiaşi proces, dar abundenţa celor virali datorată ratei superioare a transcrierii, compensează pierderea prin degradare. In celulele infectate cu VSV, mesagerii virali, în mare exces cantitativ, sunt asociaţi cu proteina N (nucleoproteina) în complexe RNP şi formează o rezervă mare de ARNm care intră în competiţie eficientă cu ARNm al gazdei. Dar, ARNm viral este tradus preferenţial chiar când abundenţa sa este diminuată de 10 ori sau mai mult: se crede că ARNm viral conţine secvenţe ce favorizează traducerea (situsuri interne care favorizează legarea ribosomilor);

– în celulele infectate cu virusul influenza este inactivat un factor celular (eIF4E) care se leagă de secvenţa de bonetare a ARNm. Pentru a se lega de capătul bonetat, eIF4E trebuie fosforilat de o kinază celulară. In celulele infectate cu virusul influenza, eIF4E este parţial inactivat prin *nivelul redus al fosforilării*. ARNm virali au acelaşi cap bonetat şi o secvenţă de 10–13 nucleotide, ca şi mesagerii celulari şi teoretic, ar trebui să fie la fel de sensibili la inactivarea eIF4E. ARNm al virusului influenza conţine o secvenţă la capătul 5' care favorizează legarea ribosomilor şi ridică nivelul traducerii.

19.2.1.2. Modificări ale metabolismului proteinelor celulare

Sinteza, prelucrarea şi transportul proteinelor virale constituie domeniul de intersecţie a funcţiilor celulare şi virale, deoarece virusurile intră în competiţie cu mecanismele sintezei proteinelor celulare. ARNm virali şi celulari intră în competiţie directă pentru traducere. Atât celula cât şi virusul sunt dependente de aparatul celular de sinteză şi transport proteic.

Inhibiţia sintezei proteinelor celulare este una dintre consecinţele cele mai evidente ale infecţiei cu virusuri citocide, iar retravirusurile produc perturbări minime. Intre cele două extreme se situează raporturile celorlalte virusuri cu substratul în care se multiplică.

Mecanismele moleculare ale *întreruperii* sintezei proteinelor celulare şi ale schimbării specificităţii aparatului de sinteză celulară sunt multiple.

Virusurile citocide (polio, herpes, adeno, vaccinal) *întrerup selectiv sinteza proteinelor celulare* prin mai multe mecanisme:

- *inhibă traducerea mesagerilor celulari*
- *inactivează factorii* specifici ai sintezelor celulare;
- prin *transcrierea şi traducerea preferenţială a mesagerilor virali.*

Mecanismul *traducerii* discriminatorii între ARNm celular şi ARNm viral a fost dedus din faptul că inhibiţia sintezei proteinelor celulare este prea rapidă pentru a fi atribuită numai scăderii cantitative a ARNm sau inhibiţiei sintezei sale (herpes, vaccinal, rinovirus):

– ARNm al adenovirusurilor este asemănător cu ARNm celular şi este foarte eficient în competiţia traducerii cu mesagerii celulari;

– în celulele infectate cu virusul polio sau cu virusuri herpetice se produce *dezagregarea selectivă a polisomilor celulari.* Ribosomii rămân funcţionali şi disponibili pentru sinteza proteinelor virale. Pe măsură ce sinteza proteinelor virale devine detectabilă, apare o nouă clasă de polisomi, mai mari, corespunzătoare ARNm viral, care este mai mare decât dimensiunea medie a ARNm celular;

– virusul polio inactivează factori specifici ai transcrierii şi traducerii mesagerilor celulari prin intermediul proteinelor virale reglatoare, pentru că traducerea ARNm viral este independentă de secvenţa de bonetare 5'. ARNm viral are o secvenţă lungă 5' necodificatoare ce conţine un situs intern de intrare a ribosomilor.

Aproape totdeauna, în celula infectată se sintetizează o cantitate totală de proteine, mai mică decât în celula normală, deoarece, în general, infecţia diminuează capacitatea de sinteză proteică.

În multe cazuri, inhibiţia sintezei proteinelor are rolul de a inhiba *răspunsul antiviral al celulei*, iar traducerea preferenţială a ARNm viral este consecinţa adaptării virusurilor la multiplicarea în prezenţa acţiunii unor astfel de mecanisme inhibitorii.

Aproape toate ribovirusurile, în ciclul multiplicării, produc molecule de *ARN dublu catenar.* Răspunsul celulei gazdă la ARN dc este inhibiţia sintezei proteice, mediată de o *fosfo-kinază dependentă de ARN* (PKR). PKR este, în esenţă, o kinază indusă de IFN, dar cele mai multe celule exprimă constitutiv nivele semnificative ale acestei proteine. Rolul ei este de a activa răspunsul celulei la ARN dc, chiar în absenţa IFN. In prezenţa ARN dc, PKR fosforilează subunitatea α a eIF_2 şi iniţierea traducerii este astfel blocată.

Fenomenele de întrerupere au efect citopatic, pentru că inhibă metabolismul celulei.

19.2.2. Pierderea funcţiilor membranelor celulare

Virusurile alterează membrana celulei gazdă, pe două căi:

- modifică permeabilitatea membranei citoplasmatice;
- induc fuziunea membranei cu celulele învecinate.

Ambele procese sunt rezultatul *diminuării sau stopării biosintezelor* proprii celulei, precum şi al *înlocuirii* proteinelor celulare membranare, cu glicoproteine ale peplosului viral. Astfel se perturbă echilibrul mediului ionic intracelular, diminuează rata transportului nutrienţilor în celulă şi a eliminării produşilor de catabolism.

Cele mai evidente modificări ale membranei citoplasmatice sunt detectabile la celulele infectate cu virusuri învelite (herpes, mixo-, paramixovirusuri). Celulele au frecvent tendinţa de a fuziona, producând uneori *sinciţii gigante* sub forma unor mase mari de citoplasmă, delimitate de o membrană, care pot include zeci sau chiar sute de nuclei.

Procesul fuziunii celulare poate fi indus de *proteinele învelişului viral*, în special în cazul în care învelişul conţine proteine de origine celulară. Fuziunea a fost studiată în culturi de celule infectate cu virusul Sendai (un paramixovirus), care acţionează cu mare eficienţă, ca agent fuzionant. După multiplicarea virală, sinciţiile se lizează.

Procesul de fuziune celulară a fost studiat după infecţia substratului celular cu virusul inactivat prin iradiere. Virusul iradiat îşi pierde capacitatea de multiplicare, dar le păstrează pe cea hemaglutinantă

şi fuzionantă. Un virion în raporturi spaţiale strânse cu două celule, favorizează formarea unei punţi membranare ce se extinde treptat, rezultatul fiind fuziunea completă a celor două celule.

Factorul fuzionant al învelişului *paramixovirusurilor* este o proteină specifică polifuncţională (proteina F), implicată în iniţierea procesului infecţios, prin fuziunea învelişului viral cu membrana celulei sensibile, în hemoliza virală şi în fuziunea celulară. Proteina F îşi exercită efectul fuzionant, numai dacă este inclavată în dublul strat lipidic al învelişului viral şi dacă este menţinută în contact strâns cu membrana celulară, prin intermediul hemaglutininelor.

Fuziunea "din exterior" se produce numai după expunerea celulelor sensibile la doze mari de virioni infecţioşi sau inactivaţi (câteva mii de particule/celulă).

Infecţia *naturală* se face totdeauna cu un număr mic de virioni şi fuziunea este tardivă, după desfăşurarea ciclului de multiplicare. Fuziunea este mediată de glicoproteinele virale inserate în membrană. Este aşa numita "fuziune din interior", a cărei consecinţă este formarea *sinciţiilor* sau *policariocitelor*. Efectul fuzionant este foarte evident la *Paramyxovirus* şi *Pneumovirus* (virusul respirator sinciţial).

Scăderea rezistenţei membranelor lizosomale determină eliberarea enzimelor hidrolitice în citoplasmă şi prin aceasta, agravarea celorlalte mecanisme de producere a ECP.

În celula animală, modificările lizosomale evoluează în două etape: a)creşterea permeabilităţii membranelor (cu păstrarea conţinutului enzimatic); b)difuzia enzimelor lizosomale în citoplasmă şi absorbţia lor secundară în nucleul celulei infectate, asociată cu modificări morfologice (rotunjirea celulei) şi pierderea afinităţii pentru coloranţii vitali.

19.2.3. Modificări ale citoscheletului

În timpul infecţiei, majoritatea ribovirusurilor induc modificări morfologice pronunţate, al căror rezultat este rotunjirea celulei. Modificările se datorează acţiunii unor molecule virale, asupra componentelor citoscheletului sau sunt cauzate de inducerea apoptozei.

Citoscheletul este format din 3 elemente structurale: *microfilamente* alcătuite din subunităţi de *actină, microtubuli* formaţi din *subunităţi de tubulină* şi *filamentele intermediare*.

Actina este una dintre cele mai abundente şi conservate proteine ale celulei eucariote. Actina are rol structural, rol de transport intracelular, de mobilizare a organitelor şi este determinantă pentru forma celulei. Actina monomerică, globulară (actina G) se asamblează spontan *in vitro* şi *in vivo* şi formează structuri lineare sau ramificate (actina F). Filamentele polimerizează necovalent la ambele capete, dar creşterea lor este polarizată, deoarece este mai rapidă la una dintre extremităţi. Microfilamentele de actină au diametrul de 3–6 nm, sunt grupate în fascicule şi sunt foarte dinamice: se asamblează şi se dezasamblează, cu un timp de ½ de câteva minute, datorită activităţii ATP-azice a actinei.

Microtubulii sunt structuri filamentoase, cu o lungime de ordinul μm.

Filamentele intermediare s-au denumit astfel pentru că au dimensiuni intermediare între microtubuli şi microfilamentele de actină. Sunt formate din subunităţi de *citocheratină* ce formează filamente lungi care se extind sinuos între membrana citoplasmatică şi suprafaţa nucleului, dar se găsesc şi în nucleu şi sunt specifice pentru starea de diferenţiere celulară.

După infecţia virală, frecvent se produce ruperea unuia sau mai multor sisteme de fibre ale citoscheletului, în special a *microfilamentelor de actină*. Proteaza 3C a virusului polio şi proteina M a VSV care determină inhibiţia sintezei ARN celular, clivează proteina asociată microtubulilor şi celulele se *rotunjesc*. După infecţie, matricea nucleară se dezorganizează, iar efectul se manifestă în redistribuirea cromatinei.

19.2.4. Apoptoza este consecinţa inhibiţiei expresiei genelor celulare, indusă de virusuri sau se datorează răspunsului antiviral al gazdei.

În infecţia cu virusul influenza, apoptoza se datorează răspunsului antiviral al celulei: pe suprafaţa celulei este indusă expresia receptorului Fas şi a ligandului Fas. După legarea ligandului Fas, receptorul Fas induce semnalul proapoptotic.

Apoptoza este indusă de doi factori ai virusului influenza: ARN dc şi NA. Inducerea expresiei receptorului Fas este parte a răspunsului gazdei la ARN dc şi este mediată cel puţin parţial de PKR.

În celulele infectate cu VSV, unul dintre factorii inductori ai apoptozei este proteina M, inhibitoare a expresiei genelor şi a dezorganizării citoscheletului, dar răspunsul celulei la ARN dc şi în special activarea PKR au rol la fel de important.

19.2.5. Apariţia corpilor de incluzie

Corpii de incluzie sunt *structuri celulare neoformate* după infecţie, în masa cărora se acumulează componente virale. Prin localizare, incluziile reflectă *situsul* multiplicării virale.

Incluziile virale au proprietăţi tinctoriale noi (bazofile, acidofile), se detectează în localizări specifice şi sunt utile în diagnosticul virologic. După formă pot fi sferice, ovalare, piriforme sau nedefinite, în funcţie de virusul infectant. Dimensiunile lor sunt cuprinse între 1 şi 30 μm, ceea ce le face vizibile la microscopul optic. Pe imaginile electrono-optice au structură ordonată, de cristal (la adenovirusuri), sau sunt aglomerări de virioni şi macromolecule virale (la poxvirusuri).

Unice sau multiple, incluziile sunt localizate în *citoplasmă* (în celulele infectate cu poxvirusuri, ribovirusuri), *în nucleu* (în celulele infectate cu dezoxiribovirusuri) sau au localizare *mixtă* (în celulele infectate cu orthomixovirusuri). Unele incluziuni sunt mai cunoscute după numele autorilor care le-au descris: corpii Babeş-Negri (virusul rabic), corpii Guarnieri (virusul vaccinal), incluziunile Cowdry (virusul herpes). Formarea incluziilor alterează distribuţia componentelor celulare şi constituie o formă de ECP.

Semnificaţia biologică a incluziunilor virale este evidentă şi din faptul că ele se dezvoltă pe măsura progresiei ciclului de multiplicare. Incluziunile sunt markeri structurali ai procesului dinamic prin care celula produce virus. Ele reprezintă, în general, "fabricile de virus" în care are loc sinteza componentelor virale (acizi nucleici, proteine) şi are loc morfogeneza virionilor.

Prin specificitatea şi localizarea lor, incluziunile indică sediile celulare ale multiplicării virale. Ele sunt un indicator util pentru demonstrarea naturii virale a unor leziuni celulare, iar morfologia şi dispoziţia lor caracteristică în anumite celule, constituie un important criteriu de diagnostic în unele viroze. Astfel, punerea în evidenţă a incluziilor rabice (corpusculii Babeş-Negri) în neuronii din cornul lui Ammon, permite precizarea diagnosticului de turbare la omul şi animalele suspectate de a fi murit după infecţia cu acest virus.

Bibliografie

Andrew Ball L. 1998. Virus- Host Cell Interactions, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Subak-Sharpe J. H., Pringle C. R. 1990. Viral information controlling DNA and RNA Animal Virus Replication, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Knipe D. M. 1991. Virus-Host-Cell Interactions, în vol. Fundamental Virology, Sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Carrasco L. 1995. Modification of Membrane Permeability by Animal Viruses – Advances in Virus Research, vol. 45: 61–110.

Knipe D. M. 1996. Virus-Cell Interactions, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Bablanian R. 1972. Mechanisms of Virus Cytopathic Effects – Symposia of the Society for General Microbiology, no. XXII. Microbial Pathogenicity in Man and Animals.

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

20. RELAŢIILE DINTRE VIRUSURI ŞI ORGANISME

Virusurile sunt totdeauna *potenţial patogene* pentru organismul gazdă, deoarece alterează profund activitatea fiziologică a celulei.

Patogeneza studiază mecanismele prin care un agent infecţios alterează starea fiziologică a gazdei şi se exprimă cantitativ prin *virulenţa* virală.

Virulenţa este o proprietate multifactorială, care exprimă cantitativ capacitatea unui virus de a se multiplica, de a se disemina în organism în competiţie cu efectorii răspunsului imun şi de a produce stări patologice de diferite intensităţi. O tulpină virală este mai virulentă decât alta dacă produce o infecţie mai severă la alţi indivizi ai aceleiaşi linii genetice. *In vitro* virulenţa se evaluează prin intensitatea ECP, dar *in vivo* se evaluează după alţi parametri. Virusurile citocide *in vitro* nu sunt în mod obligatoriu virulente *in vivo* şi invers.

Virulenţa se exprimă totdeauna în raport cu un organism dat. Virusurile care au efect citolitic (citocid) au virulenţă extremă, în timp ce virusurile ale căror interacţiuni cu celula gazdă se manifestă prin efect citochinetic (transformant), au o virulenţă moderată (sunt virusuri temperate).

Pentru a produce manifestări clinice, virusul trebuie să infecteze celulele sensibile, să se multiplice şi să producă leziunile celulare. Înţelegerea mecanismelor moleculare ale patogenezei este o condiţie pentru alegerea strategiilor antivirale specifice. Virulenţa este dependentă de câteva particularităţi ale gazdei:

– de *numărul celulelor sensibile* şi de posibilitatea de acces a virusului la substratul celular permisiv. Liza unui număr mic de celule specializate funcţional poate periclita viaţa, dar distrugerea unui număr mare de celule mai puţin specializate (celulele epiteliale) produce efecte mai puţin grave;

– de *intensitatea şi complexitatea reacţiilor de apărare* a gazdei, care determină eliminarea şi inactivarea virusului şi/sau a celulelor infectate.

20.1. Căile de intrare a virusurilor

Tegumentul intact este barieră impermeabilă pentru agenţii infecţioşi. Puţine virusuri depăşesc această barieră şi iniţiază infecţia prin *microleziuni* (pox, papiloma, herpes). Epiderma nu este vascularizată şi infecţia poate să rămână localizată (papiloma, moluscum contagiosum). Virusurile inoculate profund prin derm, în ţesutul subcutanat şi în muşchi prin injectare, prin acupunctură, prin perforare (piercing), tatuaj sau prin muşcătură (VHB, virusul rabic) se diseminează la distanţă.

Leziunile datorate erupţiilor tegumentare se numesc *macule, papule, vezicule sau pustule*. Maculele se datorează dilatării vaselor sanguine dermice. Dacă se produce edemul şi infiltrarea leucocitară, macula progresează la *papulă*. Dacă leziunea implică epiderma se numeşte *veziculă* şi evoluează la stadiul de *pustulă* dacă lichidul veziculei este infiltrat cu leucocite (PMN). *Erupţia hemoragică* şi cea *peteşială* se produc după implicarea severă a vaselor sanguine dermice. Unele virusuri (pox, herpes) se diseminează prin leziunile tegumentare, deoarece se găsesc la titru înalt în lichidul veziculo-pustular şi virusul trece prin contact direct la o altă gazdă.

Conjunctiva este locul de intrare a unor virusuri care produc conjunctivita sau se diseminează (de exemplu, infecţia paralitică cu enterovirus). Inocularea directă a adeno- în conjunctivă produce keratoconjunctivita. Conjunctivita 'de piscină' este produsă de adeno- 3 şi 7, dar şi de echo- sau coxsackievirusuri. Rareori, virusul se diseminează din conjunctivă în SNC, unde produce poliomielită, radiculomielopatie sau pareze ale nervilor cranieni.

Mucoasa *tractului respirator* este protejată de agenții infecțioși prin secreția mucoasă, deplasată sub acțiunea mecanică a cililor celulelor epiteliale, de IgA și de celulele limfoide din tonsile și adenoide. In alveole se găsesc macrofage. Temperatura de 33° în partea superioară a tractului este protectoare față de infecția cu multe virusuri, dar este optimă pentru infecția cu rinovirusuri.

Virusurile pătrund în tractul respirator, odată cu aerosolii generați prin tuse sau strănut sau cu saliva. Aerosolii cu diametrul mai mic de 5 μm ajung în spațiul alveolar. Virusurile învelite sunt mai stabile la condițiile mediului extern (uscăciune) comparativ cu cele nude, ceea ce explică frecvența mai mare a infecțiilor produse de influenza, parainfluenza, VRS, față de cele cu virusuri nude (adeno, rhino).

Tractul gastro-intestinal este locul de intrare a unor virusuri care produc infecții locale, limitate la celulele epiteliale adiacente lumenului (rota-, corona-, adeno-) sau invadează și produc infecții sistemice (entero-, VHA). Infecțiile sistemice semnifică traversarea mucoasei și invadarea țesuturilor subiacente. Mediul acid al stomacului, proteazele secretate de celulele gastrice și pancreatice și secreția biliară ce se varsă în duoden creează un mediu restrictiv pentru infecțiozitatea unor virusuri. Mucusul este secretat de celulele gastrice și intestinale și conține IgA. Picornavirusurile sunt rezistente la mediul acid, cu excepția rinovirusurilor. La multe virusuri, modificările proteolitice stimulează infecțiozitatea virală. Enzimele proteolitice induc dezagregarea parțială a capsidei virusurilor nude (picorna-, reo-) și învelite, stimulând infecțiozitatea lor: capsida externă a reovirusurilor este dezagregată parțial, odată cu activarea ARN-polimerazei. Invers, virusurile care suferă modificări ample sub acțiunea enzimelor proteolitice sunt inactivate.

Invelișul viral este sensibil, fiind disociat sub acțiunea detergentă a sărurilor biliare, iar capsida este rezistentă. Așa se explică faptul că virusurile învelite (cu excepția corona-) nu pătrund pe calea gastro-intestinală.

Rotavirusurile produc infecții limitate exclusiv la epiteliul mucoasei intestinale, iar reovirusurile aderă de celulele M și ajung în plăcile Peyer.

Tractul *urogenital* poate fi locul pătrunderii unor virusuri, prin leziunile epiteliului vaginal sau prin traumele uretrei: HIV, HSV, HPV 11, 16, 18 (produc negi genitali = condiloma acuminata), iar adeno- 11 și 21 produc cistita hemoragică acută la băieți. Poliomavirusurile produc virurie, fără simptome clinice. Unele virusuri ajung în rinichi, probabil pe cale sanguină și apoi intră în urină.

Infecția placentară. Cele mai multe infecții virale materne nu implică fătul, dar unele virusuri traversează placenta, infectează fătul și influențează dezvoltarea pe cale directă, ca rezultat al infecției țesuturilor. Reacția febrilă a organismului matern poate să influențeze indirect dezvoltarea fătului. Efectele infecției fetale sunt corelate direct cu stadiul dezvoltării. Infecțiile congenitale sunt produse de HSV, VZV, VHB, de virusul rujeolei, oreionului, HIV, parvo-, rubeolei și de unele enterovirusuri.

Căile de transmitere a virusurilor nu sunt reciproc exclusive: un virus se transmite pe mai multe căi.

În general, virusurile se multiplică la poarta de intrare (în mucoasa tractului respirator, gastro-intestinal) și nu se diseminează în alte țesuturi. Situsul la nivelul căruia virusul se multiplică după ce a pătruns în organism se numește *focar de infecție primară.* In raport cu tropismul pentru diferite celule, unele virusuri se multiplică și produc leziuni la nivelul porții de intrare.

Din focarul primar, infecția se diseminează în două modalități:

– *trecerea directă* a virionilor din celula infectată în celulele adiacente, în special pentru virusurile care înmuguresc și induc fuziunea celulelor. Infecțiile progresează foarte rapid;

– *eliberarea virionilor în spațiul extracelular* și reluarea ciclului de adsorbție și fixare pe celulele adiacente. In spațiul extracelular, virionii sunt expuși mecanismelor de apărare a organismului.

Alte virusuri produc manifestări patologice la distanță de locul intrării. De la locul pătrunderii și eventual al multiplicării primare, trebuie să fie *diseminate*, pentru a ajunge la celulele sensibile, permisive pentru multiplicare. De exemplu, enterovirusurile pot să producă infecția SNC.

După multiplicarea la poarta de intrare, virusurile se diseminează pe cale sanguină, limfatică sau secreții, producând starea de *viremie*. Virionii pot fi liberi în plasma sanguină sau se asociază cu diferite tipuri de leucocite, cu sau fără multiplicare. Faza viremică este scurtă.

Patogenitatea virală s-a studiat pe modelul experimental al animalelor de laborator, dar rezultatele nu sunt întru-totul extrapolabile și analoge infecțiilor în condiții naturale, la om și animale.

20.2. Tropismul viral

Particularitățile de patogenitate a virusurilor, în special ale celor infecțioase pentru organismul uman şi animal sunt determinate de *tropismul* lor.

Tropismul sau afinitatea semnifică proprietatea unui virus de a infecta anumite specii de organisme (*genotropism**), anumite țesuturi (*histotropism*) sau anumite celule ale unui țesut (*citotropism*).

* În condiții naturale, spectrul de gazdă al unor virusuri este foarte restrâns: virusurile gripale produc efecte patologice numai la om, virusul polio şi rinovirusurile infectează numai omul, iar aftovirusul infectează paricopitatele. În condiții experimentale, unele virusuri (vaccinal, rabic) pot infecta un număr mai mare de specii animale, cu condiția utilizării unei doze de inocul suficient de mare.

Manifestările patologice ale infecțiilor virale sunt variabile şi dependente de *histotropism* şi *citotropism*. În raport cu aceste proprietăți, virusurile pot fi clasificate în următoarele categorii:

– virusuri *dermotrope*, cu afinitate pentru tegument şi mucoase (poxvirusuri);

– virusuri *neurotrope*, cu tropism pentru SNC (virusul rabic, virusurile encefalitogene, virusul polio);

– virusuri *dermo-neurotrope*, cu afinitate pentru celulele tegumentare şi pentru SNC (virusurile herpetice);

– virusuri *organotrope* (viscerotrope), cu afinitate pentru organele interne (virusurile hepatitice);

– virusuri *pantrope*, cu afinitate pentru celulele sistemului reticuloendotelial (fagocite, celulele reticulare ale sinusurilor venoase din splină şi ganglioni, celulele endoteliale ale vaselor sanguine şi limfatice, fibroblastele țesutului conjunctiv).

În general, virusurile au afinitate, îndeosebi pentru celulele normale sau patologice care se divid cu o rată mai înaltă, dar şi pentru unele celule care nu se divid, înalt specializate ca structură şi funcție. De exemplu, virusul polio infectează motoneuronii din măduvă, dar în cazurile grave, chiar neuronii din coloanele posterioare, din ganglionii spinali senzitivi, din substanța reticulată, din nucleii cerebeloşi, din cortexul motor din girul precentral.

Mecanismele tropismului celular par a fi condiționate de doi factori:

– de existența *moleculelor* membranare cu rol de receptor, care condiționează interacțiunea virusului cu suprafața celulei. Ipoteza a fost dedusă din modificarea sensibilității unor celule după cultivare. De exemplu, rinichiul uman şi amniosul, *in situ* nu sunt infectate de *Poliovirus*, dar devin foarte sensibile după cultivare. Sensibilitatea este corelată cu expunerea pe suprafața celulelor, *in vitro*, a situsurilor de legare a virusului. Receptorii sunt molecule cu rol în metabolismul celular, dar au afinitate şi pentru virus;

– de *starea de permisivitate* a celulei. Virusurile se multiplică în celulele care nu pot să declanşeze un răspuns antiviral mediat de IFN α/β. Multe virusuri pot interacționa cu mai mulți receptori ai celulei, prin intermediul unuia sau mai multor liganzi.

20.2.1. Neurotropismul

Virusul rabic este singurul care manifestă un neurotropism bine exprimat. Celelalte virusuri care infectează SNC nu sunt neurotrope în sensul strict al afinității lor pentru sistemul nervos. Gradul de afinitate pentru SNC şi gravitatea infecțiilor pe care le produc sunt exprimate în termeni diferiți:

- neurotropismul – afinitatea unui virus pentru celulele SNC (neuroni şi celule gliale);
- neuroinvaziv – capacitatea de a pătrunde în SNC;
- neurovirulență – capacitatea de a produce infecții ale SNC cu consecințe clinice.

Neuroinvazivitatea şi neurovirulența nu sunt proprietăți totdeauna corelative: de exemplu, virusul oreionului este foarte neuroinvaziv, dar neurovirulența este limitată şi produce meningită, însă chiar în cursul infecției parotidiene obişnuite se produc modificări ale compoziției LCR la peste 50% dintre pacienți, ceea ce sugerează posibila implicare a sistemului nervos; HSV are neuroinvazivitate scăzută, infectează rareori SNC, dar neurovirulența este înaltă şi consecințele clinice pot fi foarte grave.

Țesutul nervos are particularități structurale şi funcționale, care oferă condiții unice pentru multiplicarea virusurilor, datorate în primul rând barierei sânge-creier.

Conceptul de 'barieră' a fost formulat odată cu observația că albastru tripan (trypan blue), un colorant vital, după ce este injectat în circulația sistemică, colorează toate țesuturile cu excepția creierului și măduvei spinării. Bariera capilarelor cerebrale rezidă în joncțiunile strânse dintre celulele endoteliului capilar, o membrană bazală densă și în numărul mare al rețelei de prelungiri ale astrocitelor. Coloranții vitali nu străpung bariera și nu colorează SNC.

În plexurile coroide, bariera sânge-creier are o structură diferită: capilarele plexului coroid sunt fenestrate, iar membrana bazală lipsește. Coloranții și particulele trec în plexul coroid, dar nu pătrund în LCR, datorită joncțiunilor strânse localizate în zona apicală a celulelor epiteliului secretor al plexului coroid. Între măduva spinării și canalul ependimar schimbul este liber.

Bariera sânge-creier exclude virusurile, limitează accesul celulelor imunocompetente și anticorpilor. SNC nu are sistem limfatic intrinsec și are puține celule fagocitare. Barierele fizice care se opun invaziei virale, împiedică accesul celulelor care epurează virusul. Din acest motiv, infecțiile persistente sunt mai comune în SNC.

Spațiile interneuronale sunt de 10-15 nm, mult mai mici decât cele mai mici virusuri, fapt care restricționează diseminarea virusurilor și a celulelor inflamatorii.

Virusurile neurotrope sunt transportate de la locul inoculării, în SNC, prin filetele nervoase și prin sânge, iar în interiorul SNC prin fibrele interneuronale. Virusurile rabic, HSV și polio sunt transportate în nevrax prin filetele nervilor. Virionul este înglobat în vezicule la capătul terminației nervoase și este transportat anterograd (în sensul polarității fiziologice a neuronului) sau retrograd (în sens opus polarității fiziologice) spre corpul neuronilor motori sau senzitivi. Calea neuronală de intrare în nevrax este importantă în infecția primară cu virus rabic și polio.

Diseminarea olfactivă a virusului este o variantă a diseminării neuronale. Axonii neuronilor senzitivi ai mucoasei olfactive conectează mediul extern cu emisferele cerebrale: aerosolii contaminați cu virus rabic produc infecții accidentale la om și infecții ale liliecilor în peșteri. Calea olfactivă ar fi adecvată pentru diseminarea HSV, ceea ce ar explica localizarea frontală și temporală a encefalitelor.

De cele mai multe ori, virusurile invadează SNC pe *cale sanguină*. Condiția preliminară este multiplicarea tisulară urmată de o viremie cu o densitate suficientă a virionilor pentru a depăși bariera hemato-encefalică. Unele virusuri se multiplică în celulele endoteliale ale vaselor sanguine și limfatice, iar altele, în mușchii striați. Din mediul intern (sânge, limfă), virusurile sunt eliminate cu o rată dependentă de dimensiuni: virionii de dimensiuni mici (toga-, flavivirusuri) se multiplică rapid în țesuturile periferice și realizează titru viremic înalt. Alte virusuri se adsorb pe eritrocite, iar virusurile rujeolic și herpetic infectează leucocitele și scapă de epurarea de către celulele Kupffer și celulele sistemului reticulo-endotelial*.

* Conceptul de *sistem reticulo-endotelial* (SRE) a fost creat de Aschoff (1924) în care a inclus:
- fagocitele propriu-zise;
- celulele reticulare ale sinusurilor venoase din splină și ganglioni;
- celulele endoteliale ale vaselor sanguine și limfatice ;
- fibroblastele din țesutul conjunctiv.

Virusurile care se multiplică în celulele endoteliale ale capilarelor trec direct în SNC, sau prin plexul coroid. Virusurile neuroinvazive pot depăși bariera endotelială prin numărul mic de vezicule de endopinocitoză. Intrarea pe calea leucocitelor infectate este teoretic posibilă, dar traficul leucocitar în SNC este limitat. Traumatismele și procesele inflamatorii datorate altor cauze creează condiții favorabile traficului leucocitar și infecției cu virusuri transportate de leucocite. Virusul oreionului infectează epiteliul plexului coroid și trece în SNC.

Unele virusuri infectează atât neuronii cât și celulele gliale (HSV), iar altele infectează selectiv anumite tipuri de celule din SNC. Astfel, virusul oreionului infectează numai meningele și plexul coroid și produce meningite benigne, deși infecția celulelor ependimare poate produce stenoza apeductului Sylvius (conductul care leagă ventriculii III și IV) și hidrocefalia.

Infecția cu virusul polioma JC este limitată la oligodendrocite, manifestarea clinică secundară fiind *leucoencefalopatia multiplă progresivă* (LMP).

ECP și manifestări clinice. Celulele țesutului nervos infectate cu virusuri pot evolua astfel:

– celulele SNC pot fi lizate și rezultă distrugerea regională a creierului sau liza populațiilor celulare specifice;

– infecția necitopatică a celulelor SNC, fără modificări histologice evidente duce la infecția persistentă, fără manifestări clinice (de exemplu, infecția cu LCMV la șoarecele nou născut);

– celulele infectate nu sunt lizate de multiplicarea virusului, dar sunt distruse de efectorii imunitari (LCMV la șoarecele adult).

HIV nu pare să infecteze neuronii sau celulele gliale pe cale directă, dar infecția SNC este comună. Majoritatea celor infectați cu HIV au și infecție a SNC, pentru că virusul are neuroinvazivitate înaltă. HIV infectează macrofagele și microglia, derivată din macrofage. Celulele infectate pot fuziona cu neuronii, dar maladia neurologică în perioada latenței clinice este rară. In această perioadă HIV nu este neuroinvaziv. După instalarea imunodeficienței, HIV are neurovirulență înaltă: cel puțin 50% dintre pacienți fac demență* progresivă, datorată probabil proteinelor virale sau limfokinelor a căror sinteză este stimulată de antigenele virale, pentru că în SNC virusul este localizat în microglie și în macrofage. Proteinele virale și citokinele eliberate de celulele infectate sunt toxice pentru țesutul nervos sau interferă cu funcțiile neuronale, ceea ce explică encefalita cu alterarea stării mentale la unii pacienți SIDA.

* Demența este o boală cronică cu deteriorarea progresivă a funcției cognitive, produsă nu numai de prioni, ci și de HIV sau de virusul rujeolic.

Cele mai frecvente cauze ale encefalitei sunt HSV și arbovirusurile. HSV infectează neuronii și celulele gliale. La nou-născut produce encefalita necrozantă difuză, iar la adult, encefalita focală. Arbovirusurile infectează neuronii. Flavivirusurile infectează corpii striați și nucleii trunchiului cerebral, cauzând mișcări dezordonate și insuficiență respiratorie.

Infecțiile virale care implică atât creierul cât și măduva spinării sunt desemnate cu termenul de *encefalomielite*. Același termen se folosește pentru encefalita post-infecțioasă, posibil de origine autoimună. Encefalomielita post-infecțioasă apare la 3–14 zile după exantemul rujeolic și se caracterizează prin demielinizare autoimună ce pare să evolueze în absența infecției neuronului.

Sindromul PESS (panencefalita sclerozantă subacută) este o boală demențială produsă de virusul rujeolic, care infectează neuronii și celulele gliale. Infecția țesutului nervos este lentă, progresivă și difuză. Sindromul are o frecvență mică: 1/milion dintre copiii aparent sănătoși fac acest sindrom la 7–8 ani după o infecție rujeolică necomplicată. Demența evoluează lent, asociată cu mișcări mioclonice și cu titrul înalt al Ac specifici anti-virus rujeolic, în ser și în LCR. Moartea survine după circa un an, dar maladia poate avea o evoluție lentă, de până la 6 ani.

Infecțiile rabică și poliomielitică produc sindroame caracteristice datorită infecției selective a unor populații specifice de neuroni. Poliovirusul infectează neuronii motori și produce paralizia flască, iar virusul rabic infectează în primul rând neuronii sistemului limbic, alterând comportamentul: animalul devine agresiv, pe fondul unei agitații motorii accentuate, ceea ce favorizează transmiterea virusului.

20.2.2. Enterotropismul

Virusurile enterotrope sunt asociate cu maladia diareică acută. Gastroenterita la om poate fi cauzată de virusuri, bacterii, protozoare. Patogeneza diferă în funcție de agentul infecțios. Simptomele clinice sunt asemănătoare: de la cele ale regiunii superioare (vomă), până la diaree acută apoasă sau sanguinolentă, fără vomă sau simptome asociate.

Gastroenterita virală este o problemă globală de sănătate la copii. Virusurile care produc gastroenterita aparțin unor familii diferite: *rotavirusuri* (incidență 30–60%), *norovirusuri* (denumite anterior Norwalk-like virusuri sau small round structured viruses) și *saporovirusuri* (*calicivirusuri* clasice – 8–30%); *astrovirusuri* (6–9%), *adenovirusuri* enterice (grupul F – 3–6%).

Virusul Norwalk (familia *Caliciviridae*) este un agent semnificativ al gastroenteritei la om.

Familia *Caliciviridae* cuprinde 4 genuri: *Norovirus* (virusul Norwalk), *Sapovirus, Lagovirus* (virusul bolii hemoragice la iepure) și *Vesivirus* (virusul exantemului vezicular la porc, virusul felin și virusurile marine – infecțioase pentru pinipede, balene, pești).

Primele 2 genuri cuprind virusuri umane ce nu pot fi cultivate, iar ultimele 2 includ virusuri infecțioase necultivabile.

Virusul *Norwalk* produce epidemii de gastroenterită la adult, cu transmitere rapidă la persoanele de orice vârstă, iar *Lagovirus* a fost introdus în Australia, în 1995, pentru controlul populației de iepuri.

Caliciviridele se transmit prin ciclul fecal-oral. Doza infecțioasă este mică și de aceea transmiterea este foarte eficientă.

Astrovirusurile au morfologie de stea, pe preparatele colorate negativ, la microscopul electronic (ME), cu diametrul de 28–30 nm. Genomul este o moleculă de ARN mc de polaritate pozitivă. Infectează enterocitele, se elimină în conținutul intestinal la titru înalt și produc diaree la copii, în comunitățile de vârstnici și la imunodeficienți. Se transmit prin ciclul fecal-oral, prin alimentele contaminate sau prin contactul direct al persoanei contaminate cu persoane sănătoase.

Alte virusuri infecțioase ale tractului digestiv, neasociate în mod constant cu diaree :

- enterovirusuri, reovirusuri, coronavirusuri și parvovirusuri;
- HIV poate infecta direct intestinul (enterocitele ?);
- în condiții de imunosupresie, alte virusuri infectează tractul digestiv: herpes simplex, CMV.

Multe dintre virusurile gastroenterice umane nu se cultivă de loc sau se multiplică slab în culturi celulare și de aceea *izolarea* nu este o metodă de diagnostic, dar examenul ME permite diferențierea pe baza morfologiei caracteristice. Metoda examenului morfologic are o sensibilitate mică (sunt necesare 10^6 particule virale/ml). Rota- și astrovirusurile se detectează ușor pentru că sunt eliminate în număr foarte mare (10^{11} particule/ml conținut fecal). Calicivirusurile se eliberează la densități mici și numai în faza timpurie a fazei clinice.

Metoda RT-PCR este mult mai sensibilă (20-100 molecule ARN/ml sunt detectabile). RT-PCR și tehnicile serologice cu Ag recombinante au fost esențiale pentru evaluarea frecvenței infecțiilor umane cu astro- și calicivirusuri.

Cele mai multe infecții gastroenterice au 2 tablouri epidemiologice distincte:

– la copii, diareea este *endemică*, fiind produsă de rota- grup A, calici-, astro- și adenovirusuri grupul F. Până la vârsta de 5 ani, mulți copii au fost deja infectați, adeseori asimptomatic, cu toate aceste virusuri. Transmiterea este fecal-orală, dar probabil și prin aerosoli sau prin contact fizic strâns;

– *epidemiile* (produse de calicivirusuri, uneori de astro- și rotavirusuri de grup B și C) se manifestă la toate vârstele, iar agentul patogen este transmis prin alimentele contaminate (moluște) sau prin apă.

Tratamentul constă în rehidratare orală sau intravenoasă cu fluide ce conțin electroliți și zahăr.

Prelucrarea alimentelor, purificarea apei potabile și a apei din bazinele de înot, educația sanitară a lucrătorilor din industria alimentară, sunt măsuri importante pentru reducerea numărului focarelor de potențiale epidemii.

20.3. Tipuri de infecții in vivo

Interrelațiile dintre virusuri și organisme sunt modulate de virulența virală, de sistemele de apărare, de tipul celulelor infectate. Astfel modulată, multiplicarea virusurilor în organism produce mai multe tipuri de infecții: *infecția inaparentă, infecția acută, infecția persistentă*, cu diferitele sale modalități de evoluție:

- infecția cronică
- infecția latentă
- infecția lentă.

Infecțiile inaparente definesc situațiile în care virusul se multiplică într-o măsură limitată în celulele pentru care manifestă un tropism natural, dar nu determină simptome clinice. Marea majoritate a infecțiilor sunt inaparente sau produc simptome ușoare, astfel că trec aproape neobservate. Chiar cele mai virulente virusuri, produc mai multe infecții inaparente decât infecții clinice. De exemplu, virusul polio manifestă un tropism evident pentru celulele mucoasei digestive, dar infecția evoluează inaparent. Leziunile poliomielitice, cu manifestări patologice apar la un număr redus de persoane, la care virusul infectează motoneuronii medulari.

Infecțiile inaparente au o importanță deosebită în *epidemiologie**. Ele reprezintă rezervoare necunoscute de virus, foarte greu de depistat. Evoluția unei infecții în forma sa inaparentă este condiționată, în principal, de sistemele specifice (răspunsul imun celular și humoral) și nespecifice de apărare (interferonii).

* Epidemiologia este un domeniu al științelor medicale care studiază căile de eliminare, de transmitere și de pătrundere a agenților patogeni în organism.

Infecțiile acute sunt consecințe rare ale infecției virale. Sunt determinate de virusurile care depășesc sistemele de apărare a organismului și produc leziuni mai mult sau mai puțin ample, cu alterarea stării generale a organismului.

Pentru infecțiile acute, perioada de incubare este urmată de perioada "de stare", cu manifestările clinice. La nivel celular, infecțiile acute sunt de tip *productiv*. Este produs virus progen și de cele mai multe ori se produce liza celulară.

Infecțiile acute au o durată limitată în timp. Rezultatul final al infecției depinde de virulența agentului infecțios și de intensitatea reacțiilor de apărare a gazdei. De cele mai multe ori, virusul este eliminat din organism, lăsând după caz, o stare de imunitate mai mult sau mai puțin solidă.

Infecțiile virale sunt, de obicei, autolimitate, dar uneori evoluează perioade lungi și se numesc *infecții persistente*.

20.3.1. Persistența virală

Infecțiile persistente definesc o relație de lungă durată a agentului infecțios, cu substratul celular sau cu organismul gazdă, uneori pentru tot restul vieții. Evoluția persistentă poate să se exprime de la început, adică din momentul infecției, sau este consecutivă unei infecții acute. Infecțiile *persistente* constituie un fenomen biologic semnificativ pentru interacțiunea unor virusuri cu gazdele lor.

Persistența este consecința faptului că dispariția simptomelor unei infecții acute nu este însoțită de eliminarea virusului. Virusul se păstrează în organism, în situsuri celulare sau anatomice unde este protejat în competiția cu efectorii răspunsului imun (tabelul 68). Persistența determină *recurența* (revenirea) formei acute a infecției și bolii sau a formei atenuate a acesteia.

Bazele moleculare ale evoluției persistente a infecției au fost studiate *in vitro*, în sisteme celulare. Rezultatele nu pot fi întru-totul extrapolate pentru a explica persistența celulară *in vivo*, deoarece infecția naturală este produsă de o tulpină sălbatică de virus, care poate interacționa cu o multitudine de tipuri celulare specializate, dar mai ales pentru faptul că *in vivo*, virusul se multiplică sub presiunea selectivă permanentă a factorilor de apărare a gazdei.

Infecțiile persistente au fost împărțite în trei categorii:

– *infecții persistente*, în cursul cărora virusul este produs permanent. Au fost denumite infecții *cronice* sau *productive*: infecțiile produse de virusul hepatitei B și C umane, de HIV și de virusul coriomeningitei limfocitare (LCM) la șoarece;

– *infecția latentă* se caracterizează prin perioada îndelungată a evoluției, în cursul căreia virusul nu este produs permanent, ci numai la intervale de timp (infecțiile herpetice);

– *infecții lente* formează un grup cu caracteristici definitorii: perioada de incubare foarte lungă (luni, ani), evoluția progresivă și lentă a procesului patologic, totdeauna fatală. La om și animale, infecțiile lente pot determina și declanșa boli neurodegenerative cronice: virusul polioma JC produce leucoencefalopatia progresivă multifocală, iar virusul rujeolei produce PESS (panencefalita sclerozantă subacută), probabil o maladie autoimună în cursul căreia neuronii nu sunt lizați. O altă infecție lentă tipică este produsă de virusul Visna (un retravirus), agentul panencefalitei bovinelor. Infecțiile lente sunt însoțite de modificări neuronale, dar reacția inflamatorie nu este stimulată.

Această clasificare este încălcată de numeroase excepții, deoarece pentru unele virusuri, persistența implică succesiunea etapelor de infecție productivă și latentă. De exemplu, virusul hepatitei B (VHB) infectează cronic (productiv) hepatocitele, dar limfocitele sunt infectate latent, iar virusul Epstein-Barr (EBV) infectează productiv celulele epiteliului faringian, dar infectează latent limfocitele B.

Pentru ca un virus să producă o infecție persistentă, trebuie să îndeplinească trei condiții:
- să nu lizeze celula infectată (efectul citopatic să fie minim);
- genomul viral să poată fi menținut pe termen lung în celula gazdă;
- sa evite detectarea și eliminarea de către efectorii sistemului imunitar.

Tabelul 68.

Infecții persistente în organismul uman produse de virusuri (după R. Ahmed, 1996):

	Locul persistenței	*Consecințe*
Adenovirusuri	Adenoide, tonsile, limfocite	Necunoscute
CMV	Rinichi, glande salivare, limfocite?, macrofage?, celule stromale ale maduvei osoase	Pneumonie, retinită
EBV	Celule epiteliale faringiene, limfocite B	Mononucleoza infecțioasă, limfomul Burkitt, carcinom nazofaringian, limfom non-Hodgkin
HSV 1 și 2	Neuronii ganglionilor senzitivi	Leziuni herpetice orale, genitale, encefalita, keratita
Virusul herpetic uman 6	Limfocite	Exantem
VZV	Neuronii ganglionilor senzitivi și celulele satelite	Varicela zoster.
VHB	Hepatocite, limfocite?, macrofage?	Hepatita, carcinom hepatocelular
VHD	Hepatocite	Exacerbarea infecției cronice cu HBV
Papiloma virus	In celulele epiteliale tegumentare	Papiloma, carcinoma
Parvovirus B_{19}	Celulele precursoare ale eritrocitelor din măduva osoasă	Anemie hemolitică aplazică, deficiența cronică a măduvei osoase
Polioma virus BK	Rinichi	Cistita hemoragică
Polioma virus JC	Rinichi, oligodendrocite în SNC	Leucoencefalopatie multifocală
VHC	Hepatocite, limfocite? macrofage?	Hepatita, carcinom hepatocelular
Virusul rujeolei	Neuroni și celule gliale? în SNC	Panencefalita sclerozantă subacută
Rubela virus	SNC	Panencefalita progresivă, diabet-insulino-dependent? artrita juvenilă?
HIV	Limfocite T_{CD4}, monocite, macrofage, microglie,	SIDA
HTLV 1	Limfoc l limfocite T	Leucemia celulelor T, polimiozită
HTLV 2	Limfocite T	Necunoscută

Virusurile care *in vitro* produc infecții echlibrate cronice, adică infectează productiv dar nu lizează celula, evoluează ca infecții persistente. Ele nu perturbă echilibrul funcțional al celulei și persistă ca infecții cronice de lungă durată (de exemplu, virusul corio-meningitei limfocitare la șoarece (LCMV) și virusul hepatitei B (VHB).

Infecțiile persistente sunt produse și de virusurile cu potențial litic, când infectează celule nepermisive, sau atunci când se selectează în timp, variante virale mai puțin virulente. Un virus dat poate fi litic pentru unele celule, dar produce infecții echilibrate pentru altele. De exemplu, HIV lizează limfocitele T, dar este mai puțin virulent și litic pentru celulele seriei monocit-macrofag.

20.3.2. Mecanismele persistenței virale

Infecția persistentă corespunde interacțiunii virus-celulă de tip independent echilibrat. In această interacțiune, virusul pare a fi pasiv, adică nu codifică factori inductori ai infecției persistente, spre deosebire de infecția lizogenă fag-bacterie care este modulată de represorul fagic.

Infecțiile latente sunt produse mai frecvent de virusurile cu genom ADN, probabil pentru că celula păstrează mai ușor ADN, fie integrat, fie ca moleculă fizic-independentă.

Virusurile cu genom ADN infectează uneori celulele *nepermisive*, datorită restricțiilor de multiplicare impuse de celula gazdă. Chiar și virusurile care în mod obișnuit lizează celulele permisive, pot infecta persistent diferite tipuri de celule.

Virusurile ARN pot produce infecții cronice în cazul în care virusul se *multiplică continuu* cu o rată scăzută sau când genomul viral *se integrează* în cromosomii celulei și este replicat sincron cu ADN celular.

Persistența virală presupune, ca o condiție obligatorie, *menținerea* virusului sau cel puțin a genomului viral în celula infectată. Dacă celula infectată se divide, genomul viral trebuie să se replice

pentru a nu se dilua în celulele fiice. La retravirusuri, genomul se replică simultan cu ADN al celulei gazdă. Genomul *parvovirusurilor*, ca şi al *retravirusurilor* este integrat într-un cromosom al celulei.

În neuroni (celule care nu se divid), genomul *herpesvirusurilor* se menţine fără să se replice, sub forma unei molecule circulare fizic independente.

Evitarea efectorilor sistemului imunitar. Uneori, virusurile persistente infectează ţesuturi cu statut imunitar privilegiat. SNC este un astfel de ţesut, deoarece bariera sânge-creier limitează traficul limfocitar, iar neuroniii nu exprimă moleculele CMH I şi II şi după o posibilă infecţie nu pot fi detectaţi de limfocite.

Unele virusuri care infectează persistent, exprimă într-o măsură limitată informaţia lor genetică. De exemplu, genele HSV în neuroni nu sunt exprimate, cu excepţia unei regiuni a genomului. In neuronii infectaţi, proteinele virale sunt practic absente, neuronii nu expun la suprafaţă proteine virale şi nu sunt detectaţi de efectorii sistemului imunitar. Dar starea de latenţă este defavorabilă propagării virusului. Latenţa este întreruptă de infecţia productivă în celulele epiteliale permisive.

Epiteliile sunt, de asemenea, situsuri privilegiate imunologic, deoarece efectorii IMC trebuie să traverseze membrana bazală şi bariera endoteliului vascular. Limfocitele au acces limitat la epiteliul tegumentar, la epiteliul nefronilor sau la epiteliile glandelor exo- şi endocrine. Aceste ţesuturi sunt infectate persistent de papovavirusuri.

Poliomavirusurile BK şi *JC* persistă în *rinichi*, cu eliberare virusului progen pentru perioade lungi, *EBV* şi *CMV* – în glandele salivare, iar virusurile *papiloma* persistă în ţesutul epitelial tegumentar.

Virusurile, în special cele cu genom ARN (HIV, VHC), suferă *evenimente mutaţionale* cu o frecvenţă mare, iar în condiţiile presiunii selective de apărare specifică, variantele antigenice apar cu rapiditate. Variaţia antigenică se produce chiar şi la virusurile care infectează persistent, în special la lentivirusuri (de exemplu, virusul anemiei infecţioase equine, virusul Visna al ovinelor, virusul artritei/encefalitei caprinelor, HIV, SIV). Serul de cal infectat neutralizează izolatele virale din episoadele clinice anterioare.

Virusurile care produc infecţii persistente la om (EBV, VHB) generează variante antigenice noi, care scapă mecanismelor recunoaşterii de către limfocitele Tc. Adenovirusul tip 2 are alte mecanisme de a evita contactul cu efectorii sistemului imunitar: proteinele E_3 şi E_{1a} se complexează cu moleculele CMH în citoplasmă şi nu mai sunt transferate pe suprafaţa celulei.

Un alt mecanism al persistenţei virale este inducerea *toleranţei imunitare*. Exemplul clasic este al virusului corio-meningitei limfocitare (LCMV), care, la şoarecii infectaţi *in utero,* elimină selectiv clonele de limfocite reactive şi produce o infecţie persistentă cu viremie, pentru tot restul vieţii. Persistenţa este însoţită de absenţa limfocitelor Tc reactive faţă de antigenele virale. Virusul hepatitei B utilizează aceiaşi strategie a inducerii toleranţei imunitare, prin inundarea organismului cu antigene virale sintetizate în mare exces.

Unele virusuri persistă la nivel populaţional: exemplul clasic este oferit de variantele ce apar prin mecanismele de *shift* şi *drift genetic* ale celor două glicoproteine de înveliş (HA şi NA). Virusul influenza nu produce o infecţie persistentă în organismul uman, dar apariţia sezonieră a variantelor realizează persistenţa în populaţia umană.

20.3.3. Importanţa infecţiilor persistente

Infecţiile persistente cronice creează o stare de purtător, însoţită de eliminarea continuă a virusului, o premisă a transmiterii la gazde noi.

Infecţiile persistente sunt foarte răspândite în natură. Sunt frecvente la animalele de laborator şi prezintă o importanţă practică deosebită, deoarece, după inocularea experimentală cu microorganisme patogene sau cu virusuri, există posibilitatea activării infecţiei latente. Infecţia virală latentă activată poate să modifice particularităţile de patogenitate a agentului inoculat experimental şi chiar să domine tabloul simptomatologic.

Infecţiile persistente sunt răspândite la *artropode* (căpuşe, insecte). Ele reprezintă mari rezervoare de virus în natură, deoarece sunt gazde în care se multiplică virusurile patogene pentru om şi animale.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Numeroase *plante* de cultură sau din flora spontană sunt infectate persistent de virusuri cu spectru de gazdă foarte larg, care infectează alternativ, organismul vegetal şi animal. Ele creează rezervoare necunoscute de virusuri, din care este posibilă evoluţia unor virusuri de mare importanţă clinică pentru om şi animale.

Bibliografie

Ahmed R., Stevens J. G. 1991. *Viral Persistence*, în vol. Fundamental Virology, second edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Nathanson N. 1990. *Epidemiology*, în vol. Virology, second edition, ed. by B. N.Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Stuart-Harris C. 1990. *Epidemiology of viral infections*, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Sissons J. G. P., Oldstone B. A. M. 1985. *Host Response to Viral Infections*, în vol. Virology, ed. by B. N. Fields et al., Raven Press, New York.

Tyler K. L., Fields B. N. 1991. *Pathogenesis of Viral Infections*, în vol. Fundamental Virology, second edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Tyler K. L., Fields B. N. 1996. *Pathogenesis of Viral Infections*, în vol. Fields Virology, third edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia.

Desselberger U., Gray J. 2004. *Viruses Associated with Acute Diarrhoeal Disease*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Johnston R. T., Greenberg B. M. 2008. *Central Nervous System Viral Diseases*, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Green K. Y. 2008.*Noroviruses and Sapoviruses*, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

21. FAMILII DE VIRUSURI CU SEMNIFICAŢIE CLINICĂ

21.1. *Familia Orthomyxoviridae*

Prototipul grupului *Orthomyxo* este virusul influenza (gripal) (fig. 389), agentul patogen al gripei umane. Denumirea semnifică afinitatea virionilor pentru mucopolizaharidele şi glicoproteinele membranare ce conţin *acid sialic*.

Virusurile gripale se clasifică în trei tipuri *antigenice* majore, A (1933), B (1940), C (1947), pe baza specificităţii antigenice a *nucleoproteinei* (N) şi a proteinei M. Proteinele celor 3 tipuri nu reacţionează încrucişat cu serul imun specific faţă de una dintre ele. Proteinele N şi M sunt comune pentru toate izolatele care aparţin aceluiaşi tip antigenic.

La microscopul electronic, pe preparatele *colorate negativ*, virionii influenza sunt predominant *sferici*, cu diametrul de 100–120 nm. In preparatele virale obţinute după primul pasaj în oul embrionat de găină, se observă *forme alungite*.

Structura. Virionul este învelit de peplos, derivat din membrana citoplasmatică. Pe suprafaţa învelişului, proemină spicule de *hemaglutinină* (HA) şi *neuraminidază* (NA). Sub peplos se găseşte *corpul central al virionului*, format din *proteina matriceală* (*M*), în care sunt incluse opt molecule de ARN monocatenar, asociate cu *nucleoproteina (NP)* şi cu trei proteine mari, cu funcţie *polimerazică* (*PB_1, PB_2, şi PA*), care catalizează replicarea şi transcrierea ARN.

Cele 3 polimeraze se deosebesc prin compoziţia lor în aminoacizi cu caracter *acid* sau *bazic*.

Genomul este format din *opt segmente* de ARN monocatenar, lineare, cu lungimi diferite (2341–890 nt), asociate cu capsomerele (nucleoproteina), ordonate după o simetrie helicală şi cu moleculele de ARN-polimerază. Primele 12–13 nucleotide la cele două extremităţi ale fiecărui segment genomic se conservă la toate cele 8 segmente genomice şi au rol în interacţiunea cu ARN-polimeraza. Ansamblul ARN-proteine formează *nucleocapsida*.

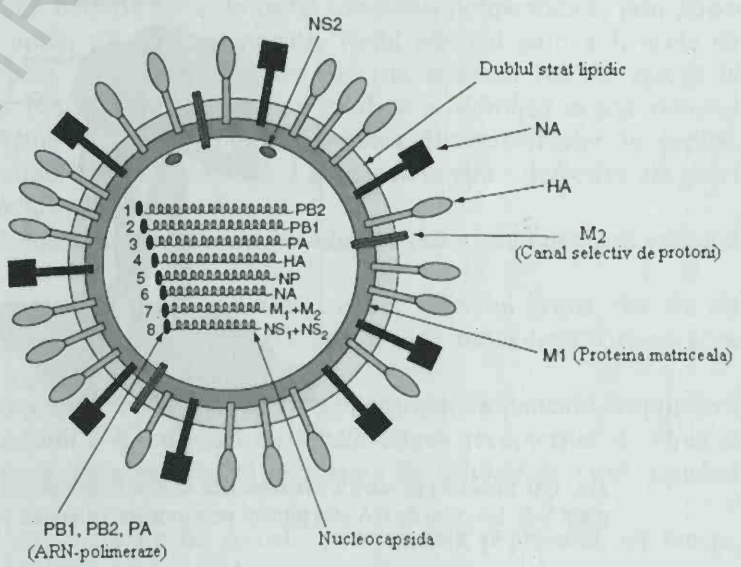


Fig. 389. Ilustrarea schematică a componentelor structurale ale virusului gripal de tip A. In peplos sunt inclavate trei tipuri de proteine: HA, NA şi M_2, cu rol de canal ionic. Proteina M_1 tapetează faţa internă a peplosului, având probabil rol mecanic, dar interacţionează şi cu cele opt ribonucleoproteine cu simetrie helicală. In regiunea centrală a virionului sunt cele opt segmente de ARNmc, având între 2341 şi 890 nucleotide. ARN este asociat cu proteina majoră (NP) şi cu cele 3 ARN-polimeraze (PB_1, PB_2, PA). Sunt indicate proteinele pe care le codifică fiecare segment genomic. Segmentele 7 şi 8 codifică câte două proteine (M_1, M_2, respectiv NS_1, NS_2). NS_1 se găseşte numai în celulele infectate şi are funcţii multiple. NS_2 pare a fi, totuşi, o proteină structurală, în cantităţi foarte mici (adaptat după Lamb R. A. and Krugg R. M., 2001).

Organizarea celor opt segmente genomice de ARN este incertă. Studiile biochimice sprijină ideia că fiecare segment de ARN se găseşte sub forma unui *complex RNP distinct*, dar imaginile

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

electrono-optice sugerează că regiunea centrală eliberată din virionul parțial dezintegrat, este un *helix unitar, rezultat prin înlănțuirea laxă* a segmentelor genomice, care se desprinde cu usurință din complex.

Moleculele de ARN sunt *lineare*, dar fiecare se pliază și formează o structură de forma unei bucle "în ac de păr". In zonele de complementaritate a bazelor se formează *punți intramoleculare* și aspectul fiecărui fragment este acela de *dublă catenă*. In zonele fără complementaritate, molecula de ARN formează bucle largi.

Virusul influenza de tip C are șapte segmente genomice.

Proteinele virale

Virusurile influenza A și B au două glicoproteine majore de înveliș, *HA* și *NA*, ce proemină sub forma unor spiculi pe suprafața virionului, în număr de 500–1000 și proteina M_2.

Hemaglutinina[*] *(HA)* reprezintă 25% din proteinele virale (fig. 390).

[*] Denumirea de HA a fost dată de Hirst (1947), după ce a observat că în oul embrionat de găină inoculat cu virus gripal, hematiile contaminante ale lichidului alantoidian sunt aglutinate.

Rolul HA este de a se lega de receptorii de suprafață ai hematiilor și ai celulelor epiteliului respirator, realizând faza de *adsorbție* a virionului.

Molecula de HA_o[*] este sintetizată ca o catenă polipeptidică unică, dar după traducerea mesajului este clivată de două ori în cisternele Golgi: inițial este clivată secvența *semnal de 16 aminoacizi* hidrofobi N-terminală, iar *al II-lea clivaj* conferă funcționalitate moleculei de HA. Secvența următoare de 328 aminoacizi formează subunitatea HA_1, iar ultimii 221 formează subunitatea HA_2. Cele două subunități rămân asociate prin legături necovalente și prin punți S-S. Ultimii 25–30 de aminoacizi hidrofobi, la capătul C-terminal al subunității HA_2, au rolul de a ancora molecula în peplosul viral.

[*] Plierea HA_o și asamblarea *in vivo* s-au evidențiat prin experiențe de marcare în puls: celulele infectate cu virus sunt marcate cu un aminoacid radioactiv. Ulterior, la diferite intervale, membranele sunt solubilizate cu detergent și puse în contact cu AMC specifici pentru HA_o monomer și respectiv AMC-anti HA trimer. Imediat după pulsul radioactiv, AMC anti-HA_o precipită toată proteina HA_o. În intervalul următor, o proporție tot mai mare de HA precipită cu AMC specifici anti- HA trimeră. Dinamica marcării în puls a arătat că polipeptidul HA_o necesită 10 min. pentru a se plia și pentru a se încorpora în trimer.

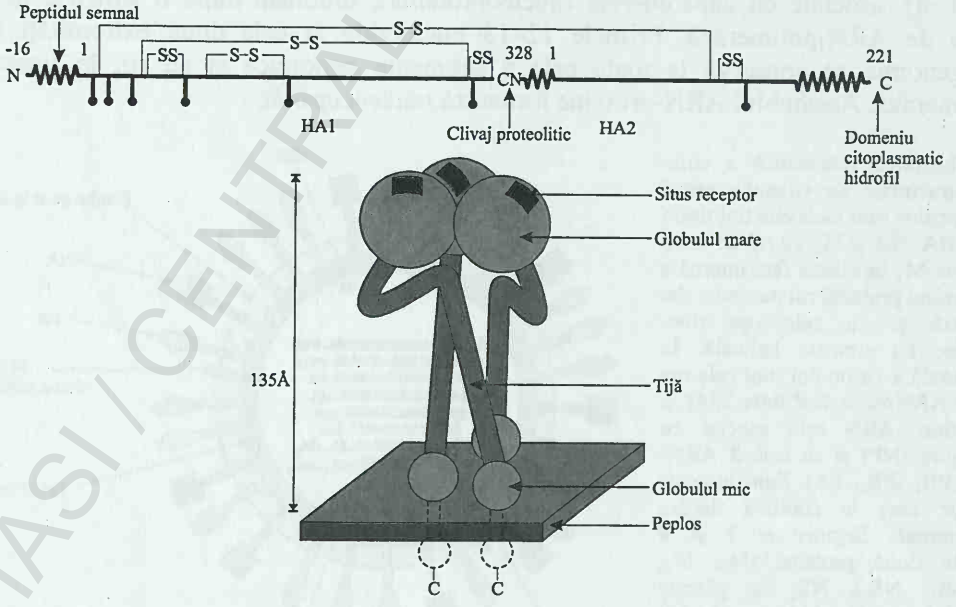


Fig. 390. Structura primară a monomerului de HA format din subunitățile HA_1 și HA_2 legate prin punți S-S. Spiculul de HA proeminent pe suprafața virionului este un trimer. Amănunte, în text.

Fiecare monomer, format din subunitățile HA_1 și HA_2 formează o structură alungită, ce constă dintr-un *peduncul* de 80 A, ce se termină printr-o regiune *globulară*, cu diametrul de 40 A, iar la capătul opus, cu o regiune *globulară* de 10 A. Fiecare spicul glicoproteic, vizibil la microscopul

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

electronic, este un *trimer de molecule* de HA. La extremitățile regiunilor globulare mari se găsesc situsurile de atașare la receptorii celulari: o mică depresiune este locul de legare a *sialil-glicolipidelor* și *sialil-glicoproteinelor*. Catenele oligozaharidice localizate pe globulul polar și pe peduncul îi conferă rigiditate și hidrofilie.

Virusurile gripale au tropism accentuat pentru celulele tractului respirator, unde se leagă specific de resturile de acid sialic ale glicoproteinelor membranare. Specificitatea legării de receptori și distribuția tisulară a receptorilor nu explică tropismul, pentru că glicoproteinele și glicolipidele cu acid sialic sunt distribuite în toate țesuturile organismului. Tropismul viral este condiționat de alți doi factori:

– starea de permisivitate a celulei semnifică existența unor factori celulari (neidentificați) care condiționează desfășurarea ciclului de multiplicare;

– absența unui răspuns imun antiviral mediat de IFN.

Neuraminidaza (NA) este un spicul în formă de ciupercă, cu un *cap de formă paralelipipedică*, format din *patru subunități* și *o tijă* ce se termină cu o regiune hidrofobă, inclusă în membrana peplosului. Spiculele de NA nu sunt distribuite uniform pe suprafața învelișului, ci în zone distincte ("petice").

Neuraminidaza este alcătuită dintr-o *singură catenă polipeptidică* de 469 aminoacizi, cu o regiune hidrofobă la capătul N-terminal, prin intermediul căreia se ancorează în peplos. După traducerea mesajului, molecula de NA nu este prelucrată (fig. 391). Ea conține câteva situsuri de glicozilare și numeroase legături S-S stabilizatoare.

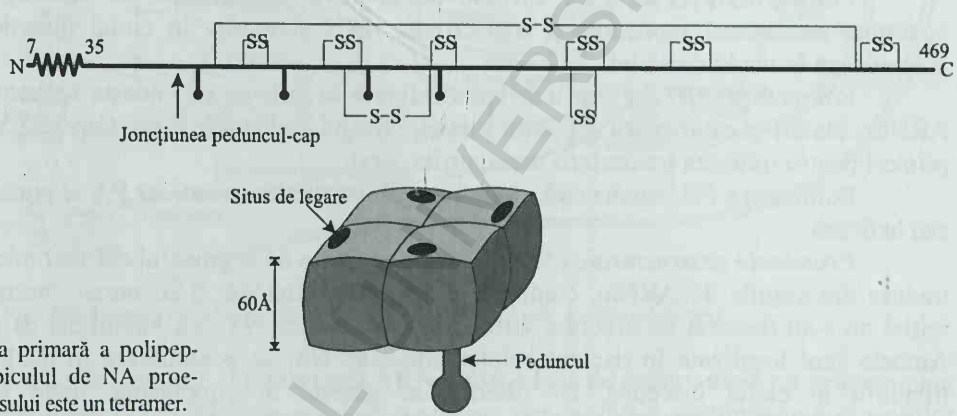


Fig. 391. Sus, structura primară a polipeptidului de NA. Jos, spicului de NA proeminent pe suprafața peplosului este un tetramer.

Polipeptidele NA se asociază, se pliază și formează *spicule tetramerice*. Tetramerul de NA constă dintr-o *tijă subțire*, ce se termină butonat, iar cele patru subunități polipeptidice, prin pliere formează atât regiunea în formă de cutie, cât și tija butonată. Rolul esențial pare a fi acela de *desializare* a glicoproteinelor din peplos. Virionii mutantelor care nu codifică NA se agregă la suprafața celulei din care înmuguresc. NA este o *sialidază*, cu rolul de a *hidroliza acidul sialic* al glicoproteinelor virale și celulare. Astfel este prevenită încorporarea glicoproteinelor în peplos, agregarea virionilor și este favorizată eliberarea lor din celulă. La mutantele virale defective ale genei NA, catenele glucidice ale HA conțin acid sialic.

O altă funcție atribuită NA ar consta în penetrarea stratului de mucus ce tapetează epiteliul tractului respirator.

Neuraminidaza nu este importantă pentru variația antigenică a virusului gripal, dar are rol important în asamblarea și eliberarea virionilor. Ariile membranare în care înmuguresc virionii și se formează învelișul viral, conțin numai glicoproteine desializate.

In vitro, virionii adsorbiți pe suprafața hematiilor, la 37^0 se desprind. Fenomenul desprinderii se numește *eluție* și se datorează activității NA, cu efect enzimatic asupra receptorilor de virus ai hematiei. Neuraminidaza are are rol în digestia enzimatică a receptorilor celulari de virus, ușurând internalizarea virionului.

Virusul influenza C prezintă un singur tip de spiculi* pe suprafața peplosului, cu funcție *h*emaglutinantă, *e*sterazică și de *f*uziune (HEF).

* Dhori- (7 segmente genomice) și Thogoto- (6 segmente genomice) sunt arbovirusuri și au o singură glicoproteină de suprafață. De aceea ICNV a așezat virusurile influenza tip C, Dhori și Thogoto, într-un gen separat de ortomixovirusurile A și B.

Nucleoproteina este proteina majoră (o moleculă la fiecare 20 nucleotide) care conferă specificitate antigenică de tip *A, B* şi respectiv *C* (denumirea veche este de antigen *S* (*s*olubil) sau antigen *g* (de *g*rup). In timpul infecţiei, NP se acumulează în nucleu. Are atât rol structural, deoarece este asociată cu ARN, cât şi rol în transcriere şi replicare: comută activitatea ARN polimerazei de la sinteza ARNm la ARNc şi ARN genomic.

*Proteina matriceală** (M_1) este cea mai abundentă, neglicozilată şi tapetează interiorul învelişului viral. Se găseşte atât în citoplasmă cât şi în nucleu.

* Proteinele M pot fi eliberate prin tratamentul particulelor virale cu tampon salin şi detergent.

Proteina M_1 este asociată cu *ribonucleoproteina.* Interacţiunile electrostatice multiple ale proteinei M_1 cu complexul ribonucleoproteic, sprijină presupunerea că înmugurirea virusurilor ARN cu genom de polaritate negativă este reglată de această proteină.

Proteina M_2 se sintetizează din acelaşi ARNm ca şi M_1, după clivare şi înnădire. Se integrează, în cantitate mare, în membrana celulei ca *tetrameri.* O cantitate mică se găseşte în peplos. Proteina M_2 are rol important în stadiul timpuriu al infecţiei: funcţionează ca un *canal de protoni* şi permite acidificarea virionului în timpul dezvelirii. Scăderea valorii pH este decisivă pentru eliberarea nucleocapsidei şi pentru succesiunea celorlalte etape ale ciclului de multiplicare virală.

Polimerazele (PB_1, PB_2, *PA*, 30–60 copii/virion) asociate cu nucleoproteina şi cu ARN genomic, catalizează replicarea şi transcrierea ARN genomic. In ciclul infecţios, polimerazele se acumulează în nucleul celulei.

Polimeraza PB_2 are cea mai lentă migrare în gel: ea recunoaşte secvenţele 5' bonetate ale ARNm celulari şi catalizează cel puţin parţial, clivajul *endonucleolitic.* Capetele 5' bonetate au rol de primeri pentru iniţierea transcrierii mesagerilor virali.

Polimeraza PB_1 catalizează alungirea ARNm viral nascent, iar PA ar putea fi o protein-kinază sau helicază.

Proteinele nestructurale (NS_1 şi NS_2), codificate de segmentul cel mai mic al genomului, sunt traduse din copiile de ARNm, continuă şi respectiv, înnădită. S-au numit "nestructurale", deoarece iniţial nu s-au detectat în structura virionului, dar ulterior NS_1 s-a identificat ca proteină structurală. Ambele sunt localizate în nucleul celulei infectate. NS_1 se acumulează în nucleu în cantităţi mari, timpuriu în ciclul infecţios, iar ulterior se găseşte în citoplasmă, unde formează incluziuni paracristaline. Ca şi NP, NS_1 şi NS_2 sunt fosforilate. NS_1, printre cele mai abundente sintetizate în celulele infectate, se leagă de secvenţa poli-A, inhibă clivarea ARN premesager, inhibă exportul nuclear al ARNm celular, asigurând rezerva de molecule de ARNm celular donoare ale primerilor bonetaţi 5' necesari sintezei ARNm virali. Astfel, este blocată expresia genelor celulare. Funcţia majoră a NS_1 este inhibiţia sintezei IFN şi blocarea răspunsului celulei la infecţia virală.

NS_2 se sintetizează în cantităţi mai mici şi apare mai târziu în ciclul infecţios. Este esenţială pentru exportul complexului RNP în nucleu. Nu mai este "nestructurală" pentru că s-a detectat (130–200 molecule) în virionii purificaţi.

Ciclul de multiplicare

Adsorbţia virionilor necesită interacţiunea spiculelor de HA cu resturile de acid sialic ale glicoproteinelor. Se cunosc peste 28 de tipuri de receptori cu acid sialic. Specificitatea interacţiunii este importantă, deoarece diferitele subtipuri de virus influenza se leagă de receptori diferiţi. Dar, patogenitatea este influenţată nu numai de specificitatea receptorului celular, ci şi de alţi determinanţi genetici ai gazdei, ceea ce face ca unele virusuri influenza să depăşească bariera de specie, prin legarea de alţi receptori.

Adsorbţia este urmată de fuziunea învelişului cu membrana endosomului, în condiţiile unui pH acid, în care are loc clivarea finală a HA în HA_1 şi HA_2. La pH acid, proteina M_1 se eliberează din RNP, permiţând complexului ARN-proteine să migreze spre nucleu. Acidifierea mediului în interiorul virionului este mediată de proteina M_2 inserată în peplos, ce are rolul unui canal protonic.

Majoritatea etapelor ciclului de multiplicare se desfăşoară în citoplasmă (fig. 392). Datorită deficienţei funcţionale a polimerazelor virale, care nu pot iniţia sinteza unei catene noi, să boneteze

capătul 3' sau să metileze capătul 5', virusurile influenza au o fază *nucleară** a ciclului de replicare. Proteinele din complexul ribonucleoproteic conţin secvenţe de aminoacizi *cariofilici*, ceea ce orientează transportul lor în nucleu, unde are loc transcrierea şi replicarea ARN.

*Faza nucleară a virusurilor gripale s-ar datora utilizării *aparatului enzimatic de înnădire a ARNm al celulei* pentru prelucrarea anumitor mesageri virali şi nu necesarului de primeri derivaţi din ARNm celulari.

Transcrierea. Fiecare subunitate genomică codifică sinteza uneia sau două polipeptide. *Mecanismul transcrierii genomului virusului influenza este unic, deoarece necesită cooperarea enzimelor virale şi celulare de transcriere.*

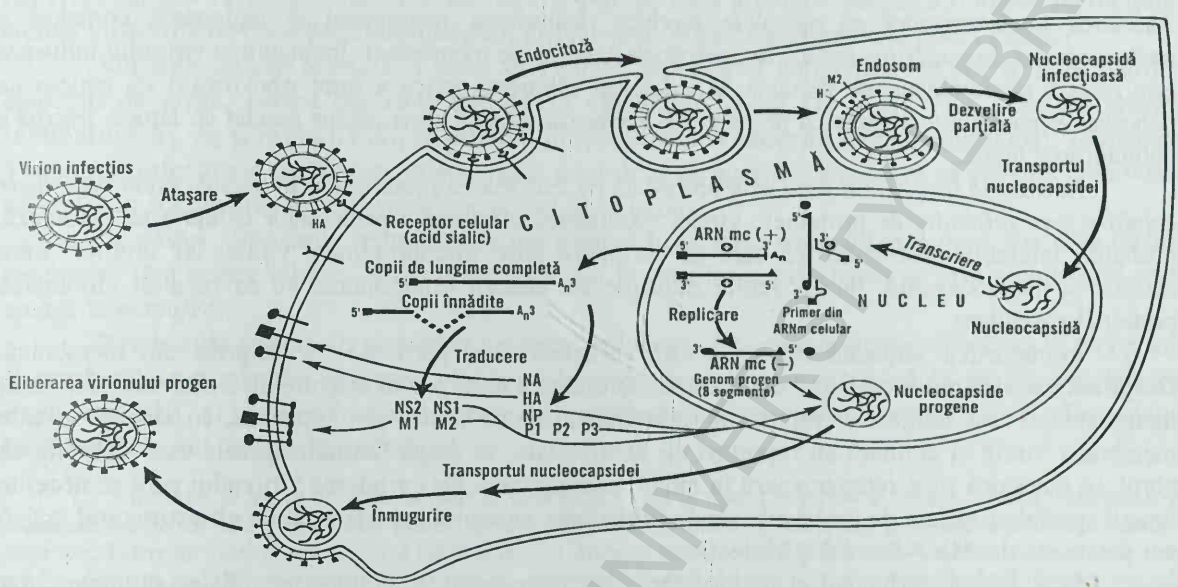


Fig. 392. Etapele ciclului de multiplicare a virusului gripal. Amănunte în text.

Dovada pentru sediul nuclear al transcrierii ARN a fost adusă de experienţele cu *actinomicina D.* Antibioticul inhibă transcrierea ADN în celulele eucariote, dar inhibă şi multiplicarea virusurilor influenza, ceea ce contrastează cu lipsa de sensibilitate a multiplicării ribovirusurilor obişnuite.

Sinteza ARNm de influenza necesită primeri bonetaţi, de 10–13 nucleotide, deoarece polimerazele virale nu iniţiază sinteza catenei, ci doar alungesc una preexistentă. *Proteina NS_1* are rol în generarea primerilor bonetaţi, deoarece are şi rol de *endonuclează. NS_1 clivează mesagerii celulari la capătul 5', dar se asociază şi cu cozile de poli-A şi inhibă transportul ARNm celular în citoplasmă.* Astfel, primerii bonetaţi devin disponibili pentru PB_1 care catalizează sinteza ARNm viral. Primele copii de ARN viral sunt traduse în polimeraze, în nucleoproteină şi în proteina NS_1. Acestea sunt transportate în nucleu şi au rol în replicarea genomului viral şi pentru asamblarea nucleocapsidelor.

Replicarea ARN influenza este strâns corelată cu procesul transcrierii. Replicarea pare a fi *catalizată de PB_1*. Enzima utilizează primerii derivaţi din ARN celular, care conţin secvenţa G-C-A. Catena genomică, de polaritate negativă este copiată în catene complementare. Unele catene de polaritate pozitivă, neprelucrate după transcriere, rămân localizate în nucleu şi au rolul de matriţe pentru sinteza ARN genomic (de polaritate negativă), pe toată durata ciclului de multiplicare. Alte catene cu polaritate pozitivă sunt prelucrate de enzimele celulei, prin bonetare la capătul 5' şi prin legarea secvenţei poli-A la capătul 3' şi au rolul de mesageri.

ARNm viral este tradus în proteine virale. Unele proteine (HA, NA, proteina M) migrează spre membrana citoplasmatică şi se inseră în stratul dublu fosfolipidic, iar altele (polimerazele, NP, proteinele NS) sunt transportate în nucleu.

Asamblarea virionilor. Cele două componente structurale majore ale virusului influenza se asamblează în compartimente celulare diferite: *nucleocapsida se asamblează în nucleu*, iar învelişul se constituie la nivelul membranei citoplasmatice.

Unitățile structurale ale *nucleocapsidei* (NP, polimerazele) sunt transportate în nucleu, unde se asociază cu *segmentele genomice de polaritate negativă*, iar uneori chiar cu segmente antigenomice. Asamblarea virionilor progeni începe cu legarea NP de ARN viral şi formează RNP. ARNm nu este recunoscut de proteinele nucleocapsidei, ceea ce sugerează că situsurile de inițiere şi recunoaştere a încapsidării genomului se găsesc numai în ARN genomic şi nu sunt transcrise în copiile de ARNm. RNP ies din nucleu în asociație cu M_1 şi NS_2 (denumită proteina de export nuclear – NEP). În *citoplasmă*, RNP se asociază cu proteina M şi sunt orientate spre situsurile membranare de înmugurire, în care s-au încorporat spiculele de NA, HA şi M_2.

Complexul inițial nucleocapsidă-spicule stimulează legarea mai multor spicule glicoproteice. Asocierea nucleocapsidei cu spiculele produce denivelarea membranei şi înglobarea completă a nucleocapsidei. Înmugurirea are loc în pontoanele lipidice ale membranei. Inmugurirea virusului influenza este reglată predominant, de proteina M_1. Analiza electrono-optică a unor ribovirusuri cu genom de polaritate negativă a evidențiat că proteina M_1 formează un strat dens, strâns asociat cu lamela internă a dublului strat lipidic.

Formarea învelişului viral este precedată de reasortarea proteinelor, în cursul căreia *proteinele celulare sunt înlocuite* de proteinele virale. Excluderea eficientă a proteinelor celulare se datorează, probabil, interacțiunilor specifice care se formează între glicoproteinele virale, iar ulterior, între acestea şi nucleocapsidă. Interacțiunile multiple ale acestor componente au ca rezultat eliminarea proteinelor celulare.

Înmugurirea virusului influenza este completă când particula s-a desprins din membrană. Desprinderea virionului parcurge două etape: a)formarea unui por al mugurelui; 2)fisiunea (clivarea) membranei. Porul mugurelui reprezintă conexiunea dintre virion şi citoplasmă, în stadiul în care membrana virală şi celulară au raporturi de continuitate. In etapa fisiunii, lipidele care delimitează porul, se amestecă şi se reorganizează în membrane separate. Desprinderea virionului pare să necesite funcții speciale mediate de proteinele virale. Eliberarea virusului este detectabilă ultrastructural la 5–6 ore şi este maximă la 7–8 ore după infecție.

ECP. Situsul principal al multiplicării este reprezentat de celulele epiteliale columnare, dar virusul gripal se poate multiplica în tot tractul respirator. Celulele se vacuolizează, pierd motilitatea cililor, mor, se descuamează.

Virusul de tip A infectează omul, porcul, calul şi câteva specii de păsări: curcă, rață, gâscă.

Virusul de tip B, în condiții naturale, infectează numai omul, iar virusul C s-a izolat de la om şi porc.

Cultivare. Virusurile influenza se cultivă în oul embrionat de găină sau în culturi celulare primare. Adăugarea tripsinei în culturile de celule permite virusului să se multiplice în liniile celulare canine (MDCK – Madin Darby canine kidney). Pentru obținerea vaccinului gripal, virusul se cultivă în oul embrionat de găină. Multiplicarea se evidențiază prin capacitatea sa de a aglutina hematiile de cocoş. Virusul obținut după pasajul inițial aglutinează hematiile de cobai la diluții mai mari ale preparatului, dar prin pasaje succesive, virusul aglutinează hematiile de cocoş la un titru superior. Schimbarea capacității de a aglutina eritrocitele se numeşte *variație O – D* (O = izolat original; D = derivat).

Epidemiologie

Infecția gripală are caracter epidemic. Epidemia semnifică izbucnirea unei maladii infecțioase cu localizare circumscrisă (oraş, țară). Epidemia începe brusc, atinge un maxim la 2–3 săptămâni, durează 5–8 săptămâni şi cuprinde o grupă de vârstă. Pandemia* este o epidemie cu extindere transcontinentală şi cuprinde majoritatea grupelor de vârstă.

* Pandemia din 1889–1891 a fost determinată de un virus asemănător H_3. Cele 3 pandemii majore ale sec. XX: *spaniolă* (1918), originară în China, produsă de H_1N_1; *asiatică* (1957), cauzată de H_2N_2; *Hong Kong* (1968) declanşată de H_3N_2. In '77 a revenit H_1N_1, foarte asemănător cu H_1N_1, care a circulat în anii '50. Din 2001 s-a izolat un reasortant H_1N_2, iar din 1997, un virus patogen aviar (H_5N_1) a infectat milioane de păsări domestice şi până în martie 2007 infectase 278 persoane, dintre care 168 decese. (Patologia pneumoniei produsă de H_5N_1 este un alt exemplu de răspuns imun înnăscut scăpat de sub control, amplificat de citokinele eliberate de macrofage şi CD). In 2007, H_1N_1 circula împreună cu H_3N_2. Cea mai severă pandemie a fost cea din 1918–'19, cu un mare număr de victime (40–50 milioane, mai ales adulți tineri), fapt care a stimulat cercetarea.

(Numărul victimelor este mult mai mare, fiindcă multe țări nu au înregistrat victimele – URSS postrevoluționară. În Africa subsahariană au murit circa 1,5 milioane persoane, iar în India a dispărut o generație întreagă).

Virusul nu dispare, ci se menține în populație prin transmitere directă de la o persoană la alta. Nu există dovada infecției latente sau persistente a indivizilor umani.

Epidemiile variază ca severitate (virulență), dar de obicei produc mortalitate la vârstnici.

Virozele sunt însoțite, în general, de o *imunitate solidă*, dar cea antigripală are un efect protector minim și de aceea epidemiile de gripă sunt însoțite de mortalitate ridicată la cei doi poli ai vârstelor.

În natură, virusul de tip A infectează omul, porcul, calul, mamiferele de apă și păsările. În izolatele de virus de tip A, de la om și animale s-au identificat *16 variante antigenice* (subtipuri) ale *HA* (H_1-H_{16}) și *9 variante antigenice* ale *NA* (N_1-N_9), pe baza absenței reacției serologice încrucișate. Numai virusurile de tip A prezintă subtipuri. Primul virus gripal s-a izolat de la porc (1930).

Varianta umană prezintă o mare diversitate genetică și antigenică, ce stă la baza marilor epidemii de gripă. Pentru om sunt infecțioase numai H_1, H_2 și H_3 și N_1, N_2, corespunzătoare subtipurilor A_1, A_2 și respectiv A_3, ce diferă prin specificitatea antigenică a hemaglutininei. Toate cele 3 subtipuri infecțioase pentru om, infectează și păsările și de aceea se consideră că ele sunt rezervorul natural, furnizând variante antigenice noi, ce pot trece la om.

La păsări*, virusurile se multiplică preferențial în celulele *tractului intestinal*, dar și în tractul respirator, fără semne clinice. Virusul este eliminat la titru înalt, prin fecale și prin ciclul fecal-oral, ajunge la *mamifere*.

Rațele sunt principalii vectori ai virusului influenza. Absența virulenței influenza la rață poate fi rezultatul unei adaptări evolutive. Puține tulpini produc infecția sistemică la păsări, asociată cu implicarea SNC și moartea într-un interval de o săptămână. Cele virulente sunt H_5 și H_7. Prin ciclul fecal-oral, virusul infectează mamiferele.

* Virusurile aviare cu virulență scăzută se multiplică numai în tractul respirator și produc infecție respiratorie de intensitate medie iar cele cu virulență înaltă (produc mortalitate ridicată) se multiplică și în alte situsuri decât tractul respirator. Diferența între cele cu virulență înaltă și cele cu virulență scăzută rezidă în șansa clivării HA_o în subunitățile HA_1 și HA_2. Clivarea condiționează activarea HA, are loc extracelular și este catalizată de proteazele de tipul tripsinei asociate secreției mucoase a tractului respirator și gastro-intestinal. Clivarea HA_o este esențială pentru ciclul de multiplicare deoarece generează domeniul de fuziune a învelișului viral cu membrana endosomului. Cele cu virulență scăzută au un singur rest de aminoacid bazic la situsul clivării moleculei precursoare al HA (HA_o), astfel încât șansa clivării scade. Subtipurile aviare înalt virulente conțin resturi bazice multiple la situl de clivare. Apariția aminoacizilor bazici multipli la situsul de clivare, prin procese mutaționale, mărește șansa ca precursorul HA_o să fie clivat de enzime cu distribuție tisulară ubicvitară, ca de exemplu, *furina*. Virusurile cu virulență înaltă se pot multiplica chiar în creier, rezultând o infecție ce se disemineză fulminant în alte țesuturi, cu mortalitate înaltă.

Pe de altă parte, dobândirea unei catene glucidice la situsul de clivare poate bloca accesul proteazelor

Dacă HA nu este clivată, virusul se poate lega de receptorii celulei, dar nu inițiază o infecție productivă.

Virusurile aviare produc focare de infecție la focă, balenă, porc și la păsări domestice (găină, curcă), dar nu se propagă cu ușurință la om. De aceea, se presupune că reasortarea segmentelor genomice se face la *porc*, o specie care are receptori ai celulelor epiteliale pentru tulpinile virale umane și aviare.

Epidemia cu virusul aviar H_5N_1 a izbucnit în 2003, cu pierderi economice uriașe, dar s-a transmis și la om, cu consecințe letale. Creșterea industrială intensivă a puilor de găină și a curcilor, comercializarea pe scară mare și transportul păsărilor vii și a produselor pe distanțe mari a ușurat propagarea virusului. Virusurile aviare nu infectează eficient omul și celelalte primate, iar virusurile umane nu se multiplică eficient la curcă, datorită mai multor factori ai gazdei și ai virusului. Unul dintre factorii virali este *specificitatea de receptor*. Astfel, virusurile influenza umane se leagă de acidul sialic (AS) legat de galactoză prin legătură α-2,6, iar virusul influenza aviar are afinitate pentru AS legat de galactoză prin legătură α-2,3. Specificitatea de receptor este unul dintre factorii ce condiționează bariera de specie. S-a evidențiat că celulele epiteliale ale tractului respirator inferior uman (bronhiole terminale și celulele epiteliale alveolare) au receptori AS α-2,6 și α-2,3. NA virusurilor aviare hidrolizează cu predilecție receptorul aviar AS α-2,3.

Patologia infecției cu H_5N_1 este diferită de a virusului influenza uman: diaree, disfuncție renală și hepatică, limfopenie severă, hemofagocitoză intensă, ceea ce sugerează infecția mai multor organe. Virusul aviar se disemineză dincolo de tractul respirator și induce eliberarea în exces a citokinelor. Tulburările diareice sugerează că virusul se multiplică în tractul gastro-intestinal, fie de la începutul procesului infecțios sau intestinul este implicat tardiv prin diseminare ulterioară.

Epidemiologia virusurilor gripale are explicații genetice și se datorează *mecanismelor de variabilitate*. Variabilitatea genetică a virusului gripal A se produce pe două căi :

- printr-o rată înaltă a *mutațiilor punctiforme*, care produc fenomenul de *drift antigenic;*
- prin fenomenul cunoscut sub denumirea de *shift genetic* (*shift*, lb. engleză = schimbare).

Shiftul genetic

Shiftul genetic este un proces de *variație genetică amplă*, asociată cu modificarea a peste 20% din totalul aminoacizilor HA. Shiftul se produce numai la tulpinile de virus influenza A şi are 3 explicații:

– *reasortarea** *segmentelor genomice* de la tulpini de virusuri cu specificități distincte de gazdă;

* Adeseori, în locul termenului de reasortare, se foloseşte, în mod greşit, cel de recombinare. Recombinarea este un fenomen rar, datorat ARN-polimerazei, care îşi schimbă matrița. Recombinarea a dus la inserția secvenței de nucleotide nevirale în gena HA.

– *trecerea unei tulpini de virus de la animale* (păsări, mamifere), care devine infecțios pentru om. Cele mai multe virusuri au o capacitate mică sau nulă de a se propaga la contacții umani, dar pandemia spaniolă (1918) a fost produsă de virusul care a trecut de la porc;

– *schimbări mutaționale masive* care se produc într-o perioadă scurtă de timp şi generează un virus nou.

Reasortarea genetică este consecința infecției simultane a unei gazde naturale cu două tulpini virale, distincte genetic şi antigenic. Cele opt segmente de ARN ale genomului influenza A sunt *independente fizic* unul de altul şi, teoretic, se comportă asemănător cromosomilor unei celule eucariote în timpul diviziunii. În virion, ele se asociază prin *interacțiuni* a căror natură nu se cunoaşte.

Porcul este de cele mai multe ori, gazdă intermediară comună pentru virusurile influenza aviar şi uman, unde are loc reasortarea segmentelor genomice.

Infecțiile experimentale mixte la animale de laborator cu variante biochimice şi antigenice distincte ale NA, au generat un virus progen "hibrid", cu caracteristicile biochimice şi antigenice ale ambelor linii parentale, ceea ce denotă capacitatea accentuată a acestui virus de a-şi modifica informația genetică.

* Porcul se infectează cu virusurile umane (H_1N_1 şi H_3N_2) prin inhalarea aerosolilor în timpul contactului strâns, iar omul poate să se infecteze cu virusul de la porc.

În celulele infectate simultan cu două tulpini virale – aviar şi uman, segmentele genomice se *redistribuie* în virionii progeni şi rezultă combinații de segmente genomice ale ambelor linii parentale. Fenomenul schimbului reciproc de segmente genomice de ARN s-a denumit *reasortare genică* şi trebuie deosebit de conceptul tradițional al *recombinării genetice*, în cursul căruia, genele se redistribuie prin fenomenul de *crossing-over*.

Genomul segmentat favorizează schimbul genelor în cazul infecțiilor mixte, în absența recombinării ARN. Reasortarea genomică a diferitelor variante genetice de virus gripal este comună, dar de cele mai multe ori este nefuncțională. Emergența unei noi tulpini de virus infecțios este limitată de *probabilitatea mică a interacțiunilor eficiente între segmentele genomice diferite*. Virionii progeni conțin tot opt segmente de ARN, dar de origini diferite*.

* H_2N_2 (agentul gripei asiatice din '57) a dobândit 3 segmente genomice (PB_1, HA, NA) de la virusul influenza aviar şi a păstrat 5 gene de la virusul uman, iar virusul din '68 a dobândit 2 gene (PB_1 şi HA) de la virusul aviar.

Reasortarea segmentelor genomice duce la *apariția unui nou subtip de virus* influenza A, care conține o nouă HA sau o nouă HA şi o nouă NA, distincte antigenic de cele care au circulat anterior. HA noii tulpini diferă prin aminoacizii săi în proporție de 25–30% de tulpina anterioară.

Apariția unui nou *subtip antigenic* corespunde unei mari *pandemii** de gripă. Pandemiile şi epidemiile de gripă au fost cauzate de 3 subtipuri diferite ale virusului de tip A: H_1N_1, H_2N_2, H_3N_2.

* Pandemia este un proces infecțios ce apare într-o regiune geografică specială, se răspândeşte pe areale foarte largi şi infectează un procent mare al populației, fiind produsă de o tulpină de virus care nu apare prin mutație din tulpinile circulante anterior.

Reasortările genetice sunt net superioare ca frecvență, fenomenelor de recombinare şi au rol esențial în determinarea ratei înalte a variației genetice şi antigenice naturale a virusului influenza.

Fenomenul reasortării genetice a virusului gripal explică gravitatea epidemiilor, deoarece *reacțiile imunitare* protectoare ale organismului sunt stimulate de antigenele virale cele mai variabile: HA și NA.

Populația umană este lipsită de protecție imunitară față de noile variante genetice și antigenice.

Următoarea pandemie majoră de gripă se va datora *reasortării genetice* a virusului gripal sau este posibilă *revenirea unei variante genetice* mai vechi, care se va propaga într-o populație căreia îi lipsește memoria imunitară.

Pandemiile de gripă au avut originea în sudul Chinei, o zonă cu climă caldă și cu o mare densitate a populației umane și animale, unde infecția gripală se produce tot timpul anului.

Virusurile de tip B și C nu suferă shiftul antigenic, probabil pentru că le lipsește rezervorul animal, dar sunt supuse driftului antigenic.

Driftul genetic

Variația antigenică de amploare limitată, a virusurilor gripale, este consecința unei forme mai puțin dramatice a variației genetice, dar produce epidemiile anuale de gripă. Driftul* (glisare) este *variația antigenică de mică amploare*, în cadrul căreia se păstrează *relațiile serologice încrucișate unidirecționale* cu varianta antigenică precedentă. Glisarea antigenică este continuă pe toată durata existenței unui subtip în populația umană.Variantele antigenice ce corespund subtipurilor de virusuri influenza A sunt supuse unui proces de *variație antigenică sezonieră limitată.* In fiecare an, virusul circulant este ușor diferit de varianta precedentă.Variația antigenică sezonieră a HA este restrânsă (< 1% din totalul aminoacizilor), dar suficientă pentru ca anticorpii specifici față de *varianta precedentă a virusului, să nu neutralizeze noua variantă antigenică.* Sub denumirea de drift sunt cuprinse toate variantele antigenice datorate modificării a mai puțin de 1% din totalul aminoacizilor HA.

* Dovada driftului a fost adusă prin analiza virusului produs timp de 10 luni de un copil cu imunodeficiență severă combinată (SCID), infectat cu virus tip A. Pe parcursul celor 10 luni s-au izolat virusuri care relevă o variație continuă, genetică și antigenică, în absența presiunii selective a răspunsului imun, cu excepția posibilă a celulelor NK. S-au observat schimbări multiple ale nucleotidelor și aminoacizilor HA și NP.

Driftul antigenic este rezultatul acumulării *mutațiilor punctiforme* prin substituție, deleție sau inserție în fiecare dintre cele opt segmente genomice. Rata erorii* de replicare a ARN este de ordinul $1/10^4$ baze, datorită absenței activității de *corectare a erorilor* (proof reading) a ARN-polimerazelor virale.

* Pentru comparație, rata erorilor de replicare a ADN, catalizată de ADN-polimeraze este mult mai mică: $1/10^9$–10^{10} baze/ciclu.

Fiecare rund de replicare a ARN viral duce la apariția unei populații mixte, cu multe mutante, majoritatea nefavorabile, dar unele mutații sunt avantajoase și devin dominante în condițiile presiunii selective a răspunsului imun.

Toate cele 3 tipuri de virusuri gripale (A, B, C) suferă driftul antigenic, dar shiftul genetic se produce numai la virusurile grupului A, deoarece numai ele au o gazdă animală, virusurile B și C infectează numai omul. Rata driftului la virusurile grupului B este mai mică decât la grupul A, iar virusurile grupului C sunt relativ stabile din punct de vedere genetic și antigenic.

Datorită variațiilor antigenice de mare amplitudine, consecințe ale reasortărilor genetice sau variațiilor de mică amploare prin fenomenul driftului genetic, infecția *gripală nu se poate eradica.*

Intervalul dintre valurile epidemice de tip A este de 2–3 ani, pentru cele produse de virusuri de tip B, de 3–6 ani, iar pentru pandemiile datorate unui nou subtip de virus A este de ordinul decadelor.

Epidemiologie. Virusul se transmite de la o persoană la alta prin aerosoli, prin contactul cu mâinile sau cu suprafețele contaminate. Virusul A infectează copiii și vârstnicii, dar diferă de virusurile de tip B și C prin caracterul antigenic mereu schimbător. Virusul B produce infecții respiratorii mai ușoare decât virusul A. Virusul C produce rare epidemii respiratorii la copii. Majoritatea virionilor sunt inactivați de barierele protectoare nespecifice: IgA sau inhibitorii nespecifici din secrețiile mucoasei. Un număr mic de celule epiteliale sunt infectate de virionii din aerosoli. Virionii progeni infectează celulele adiacente, iar NA virală scade vâscozitatea mucusului ce acoperă epiteliul și expune receptorii suprafeței celulare. Într-un interval scurt este infectat un număr mare de celule, care se lizează.

Patogenitate. Perioada de incubație este de 1–4 zile, în funcție de cantitatea de virus infecțios și de starea imunitară a gazdei. Eliberarea virusului începe în ziua ce precede apariția simptomelor, atinge valoarea maximă după 48 de ore și scade progresiv în următoarele 5 zile. Leziunile celulelor epiteliale favorizează infecția cu *Staphylococcus, Streptococcus, H. influenzae.* Creșterea sensibilității pacienților la suprainfecțiile bacteriene se atribuie pierderii funcției de clearance a cililor celulelor epiteliale, disfuncției celulelor fagocitare și existenței exudatului alveolar, un mediu optim pentru creșterea bacteriilor. Pneumonia mixtă, virală și bacteriană, este mult mai frecventă decât pneumonia primară. Co-infecția cu *S. aureus* ridică rata mortalității, deoarece bacteria secretă o protează ce clivează HA, favorizând multiplicarea virusului.

Virusurile influenza, în mod obișnuit, rămân limitate la tractul respirator, pentru că enzimele proteolitice ce clivează HA sunt comune numai la acest nivel. S-au identificat virusuri mai virulente, a căror HA este clivată de o enzimă ubicvitară – *plasmina*, iar tulpinile virale produc infecții tisulare mai extinse.

Debutul procesului patologic este brusc: febră marcată, dureri de cap, fotofobie, tuse uscată, senzație de frig. Febra și tusea cu debut brusc disting influenza de alte infecții respiratorii, de răceala comună. Spectrul simptomelor gripale este foarte variabil: de la infecția respiratorie medie, cu rinită ori faringită, până la pneumonie virală primară cu sfârșit letal. Pneumonia poate fi secundară, datorată infecției bacteriene.

Infecțiile inaparente pot avea aceiași frecvență cu cele simptomatice.

Mialgia este o trăsătură caracteristică a infecției cu influenza, dar poate să fie însoțită de miozită și mioglobinurie: mușchii sunt dureroși și duri la atingere, dar simptomele neurologice nu sunt evidente. În ser, transaminazele și creatin-fosfokinaza cresc, iar examenul histologic al biopsiei musculare relevă necroza fibrelor musculare și infiltrarea celulelor mononucleare.

Pentru dianosticul clinic ferm este necesară confirmarea laboratorului.

Virusul se izolează din secrețiile respiratorii și rareori din sânge în:

– *oul embrionat* de găină de 10 zile, prin inocularea probei (secreție nazofaringiană) în cavitatea amniotică sau alantoidiană. Inainte de recoltarea virusului, ouăle se păstrează la 33–34°.

– *celulele tulpinii MDCK* sau în culturi primare de rinichi de maimuță, dar au dezavantajul infecției naturale cu virusuri vacuolante;

– celule de rinichi de cal, hamster sau rinichi de pui de găină.

La adult, simptomele clinice includ febra, frisoane, dureri de cap, tuse uscată, dureri în gât, febră de până la 41°, ce crește în 24 de ore.

Starea febrilă durează 1–5 zile, cu o medie de 3.

Răspunsul imun. După infecția naturală sau după vaccinare se sintetizează Ac anti-HA, NA, NP și M, cu specificitate de *subtip.* Ag virale stimulatoare ale RI protector au fost identificate după injectarea separată a proteinelor virale purificate la animale. Anticorpii anti-HA neutralizează infecțiozitatea virionilor, iar anticorpii anti-NA au efect neutralizant nesemnificativ. *Nucleoproteina* induce sinteza anticorpilor specifici, numai dacă este sintetizată în exces și eliminată extracelular. Ac anti-M și anti-NP pot contribui la efectul protector, dar nu sunt factori majori.

Rezistența la infecția gripală se corelează cu titrul seric al Ac anti-HA și cu sIgA la nivelul mucoasei respiratorii. Anticorpii RIP sunt IgG, A, M, iar ai RIS sunt IgG, IgA. Anticorpii neutralizanți se leagă la un situs al HA, foarte apropiat de situsul prin intermediul căreia HA se leagă de acidul sialic. Anticorpii serici anti-HA persistă timp de decade. După driftul antigenic, Ac față de varianta anterioară sunt protectori într-o măsură importantă față de noua variantă antigenică și infecția este mai ușoară. Infecțiile sau imunizările succesive amplifică răspunsul imun față de primul subtip cu care s-a produs infecția sau imunizarea, fenomen denumit "amintirea păcatului antigenic originar".

RIMC cu activarea limfocitelor CD_4 și CD_8 are specificitate de tip, dar este protector față de toate subtipurile de influenza A și produce liza celulelor infectate.

Vaccinul. Imunizarea organismului cu vaccin viral nu conferă protecție față de infecția cu alte serotipuri, pentru că hemaglutininele lor nu dau reacție încrucișată.

Vaccinul trebuie să conțină Ag tulpinilor virale izolate recent. De aceea, conținutul vaccinului se modifică anual, în funcție de specificitatea antigenică a tulpinilor care apar sezonier.

În luna februarie a fiecărui an, WHO face evaluări privind proprietățile antigenice ale tulpinilor de virus gripal care vor circula în sezonul următor, bazate pe datele de analiză genomică, furnizate de 3 centre (Atlanta, Londra, Melbourne), la care se adaugă datele furnizate de laboratoarele naționale. Obiectivul este împerecherea proprietăților antigenice ale HA și NA ale tulpinii recomandate pentru vaccin, cât mai apropiată de acelea ale liniilor care emerg și este posibil să circule în sezonul următor.

Vaccinul de influenza este *trivalent*, cu 2 tulpini de influenza A și o tulpină B. Se folosesc 3 tipuri de vaccin inactivat:

- *vaccinul cu virus întreg* se prepară prin inocularea tulpinilor de virus circulante în oul embrionat de găină. Tulpinile celor 3 virusuri circulante, A (H_3N_2 și H_1N_1) și B care au circulat în ultimul sezon se cultivă în oul embrionat. Lichidul alantoic se recoltează după 2–3 zile de la incubare, se concentrează prin centrifugare zonală și se purifică, se inactivează cu formalina sau cu β-propiolactonă și se standardizează conținutul de HA pentru inoculare intramusculară. Cele 3 tulpini virale se amestecă pentru realizarea cantității de 15 μg HA a fiecărui virus, în fiecare doză. Vaccinul conține albumină și se administrează grupelor de vârstă cu risc înalt și celor care propagă virusul (personalul de îngrijire medicală) la cei cu risc înalt. Titrul Ac serici persistă la nivel protector 1–5 ani în funcție de tulpina de virus și de vârsta persoanei. Datorită driftului antigenic, Ac induși de vaccin devin mai puțin eficienți față de noile tulpini;
- *vaccinul cu virus dezagregat* sub acțiunea unui detergent sau a unui solvent organic. Virusul recoltat se tratează cu detergent pentru ruperea învelișului;
- vaccinul cu antigenele de suprafață – HA și NA purificate, fără ARN și proteine asociate. Se administrează ca suspensie apoasă.

După prima administrare, la persoanele care nu au experiența antigenică cu o tulpină asemănătoare de virus, răspunsul imun primar este protector, dar Ac diminuează la un titru subprotector după 6–7 luni. La cei vârstnici, cu experiență imunitară față de variante antigenice asemănătoare, răspunsul imun secundar este prompt și de lungă durată.

Vaccinul inactivat nu stimulează sinteza sIgA (din mucoase). Virusul de tip sălbatic se poate multiplica în epiteliul mucoasei nazale, dar Ac serici protejează față de invazia virală a tractului respirator inferior. Vaccinurile protejează 70–90% de efectele morbide pe termen scurt.

Vaccinul atenuat obținut prin pasaje succesive în oul embrionat de găină, prin mutație sub acțiunea factorilor chimici sau prin cultivare la temperatură mai mică (adaptare la rece). Administrat la voluntari, vaccinul atenuat nu a produs simptome clinice semnificative. Dezavantajul este că obținerea mutantelor necesită un interval de timp mai mare decât rata apariției noilor mutante sezoniere. Virusul atenuat poate să reverseze la varianta virulentă.

Virusurile *atenuate* rezultate prin una dintre metodele de mai sus se amestecă cu virusul de tip sălbatic, cu scopul de a produce reasortanți genomici (virusuri hibride), care conțin fragmente de ARN ce codifică HA și NA ale virusului sălbatic, iar toate celelalte gene derivă de la tulpina atenuată. Virusul adaptat la rece se multiplică eficient în nazofaringe după administrarea intranazală, dar nu se multiplică în mediul mai cald al țesutului pulmonar și induce imunitate protectoare locală anti-HA și anti-NA, de scurtă durată. Are avantajul administrării ușoare.

O abordare nouă constă în *clonarea genelor ADNc* care codifică Ag relevante, în vehicule adecvate expresiei genice. Vaccinul ar fi mai ușor disponibil și nu ar fi condiționat de cultivarea în oul embrionat.

Efectele adverse (inflamația locală, febră) determină reținerea față de vaccinare. Totuși, vaccinul este recomandat persoanelor cu risc înalt.

Vaccinurile *subunitare* sunt slab imunogne.

Bibliografie

Webster R. G., Doherty P. C., Tripp R. A. 1998. Influenza virus (Orthomyxovirus), Infection and Immunity, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed., ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.

Lamb R. A., Krugg R. M. 2001. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.

Murphy B. R. 1996. Orthomyxoviruses, în vol. Fields Virology, third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.
Cox N. J., Kawaoka Z. 1998. Orthomyxoviruses: Influenza, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.
Hay A. J., Skehel J. J. 1979. Influenza Virus Transcription – British Medical Bulletin, vol. 35, no. 1, pp. 47–50.
Hinshaw V. S., Olsen C. W., Dybdahl-Sissoko N., Evans D. 1994. Apoptosis: a Mechanism of Cell killing by Influenza A and B Viruses – Journal of Virology, 1994, vol. 68, no. 6: 3667–3673.
J. S. Oxford and G. C. Schild 1990. The Orthomyxoviridae and influenza, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.
Murphy B. R, Webster R. G. 1990. Orthomyxoviruses, în vol. Virology, Sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.
Kingsbury D. W. 1991. Orthomyxoviridae and Their Replication, în vol. Fundamental Virology, Sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.
Malik Peiris J. S., Menno D. de Jong, Guan Yi. 2007. Avian Influenza Virus (H5N1): a Threat to Human Health – Clin. Microbiol. Rev. April, 20: 243–267.
Shaw M. W., Arden N. H., Maassab H. F. 1992. New aspects of influenza viruses – Clin. Microbiol. Rev. January, 5, 1, 74–92.
Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses – Microbiol. Rev, 56(1): 152–179.
Lamb R. A. 2008. Influenza, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

21.2. Familia *Paramyxoviridae*

Familia *Paramyxoviridae* (*para* = alături de) cuprinde virusuri al căror genom este reprezentat de o catenă unitară de ARN, de polaritate *negativă*. Familia cuprinde 4 genuri şi reprezentanţii ei infectează numai organismele cu sânge cald, ceea ce dovedeşte că au o evoluţie recentă: *Paramyxo-, Morbili-, Rubula-, Pneumovirus* (fig. 393). Distribuţia în cele 4 genuri s-a făcut pe baze serologice (membrii fiecărui gen dau reacţii încrucişate) şi a diferenţelor funcţionale ale spiculelor de suprafaţă (HA şi NA). Virusurile care se fixează pe celulă prin glicoproteinele cu acid sialic au spicule cu activitate NA.

La g. *Paramyxovirus* şi *Rubulavirus* spiculele au activitate HA şi NA (aglutinează eritrocitele aviare şi ale mamiferelor) şi s-au numit proteina *HN*;

g. *Morbilivirus* are numai activitate HA şi spiculele se numesc proteina *H;*

g. *Pneumovirus* nu are activitate HA şi nici NA şi spiculele s-au numit proteină *G*.

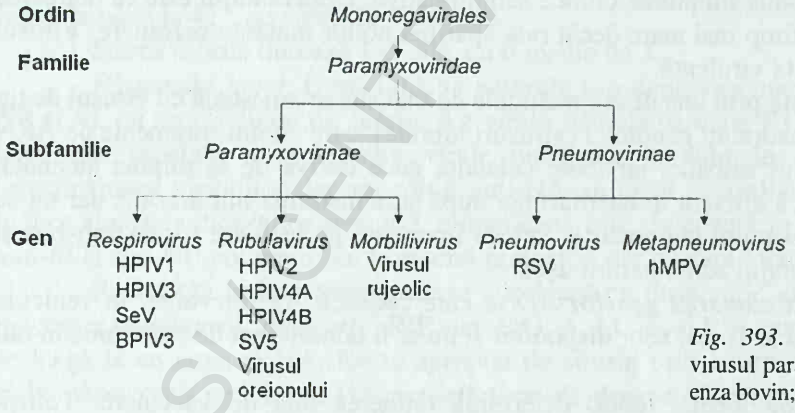


Fig. 393. Clasificarea paramixovirusurilor (HPIV = virusul parainfluenza uman; BPIV = virusul parainfluenza bovin; SeV = virusul Sendai; SV = virusul simian).

Structura. Virionul este alcătuit din două module structurale: o regiune centrală ribonucleoproteică, în care se găseşte genomul ARN monocatenar, asociat cu câteva tipuri de proteine, formând împreună *nucleocapsida* cu simetrie helicală, acoperită de *peplos*, un înveliş lipoproteic extern derivat din membrana citoplasmatică a celulei (fig. 394).

Virionii sferici au diametrul cuprins între 150–250 nm, dar în preparatul viral se găsesc şi particule mai mari (până la 400 nm), pleomorfe sau filamentoase. Variaţiile dimensionale reflectă absenţa relativă a controlului morfogenezei virale în stadiul de înmugurire. Virionii mari pot să conţină doi sau mai mulţi echivalenţi genomici. Formele filamentoase, cu diametrul extern de 18 nm şi

BCU "ASTRA" UNIVERSITY LIBRARY

cel intern de 4 nm, rezultă prin ruperea învelişului viral şi despiralizarea nucleocapsidei şi sunt structuri flexibile: se despiralizează în prezenţa concentraţiei crescute de săruri şi se spiralizează când forţa ionică a soluţiei scade.

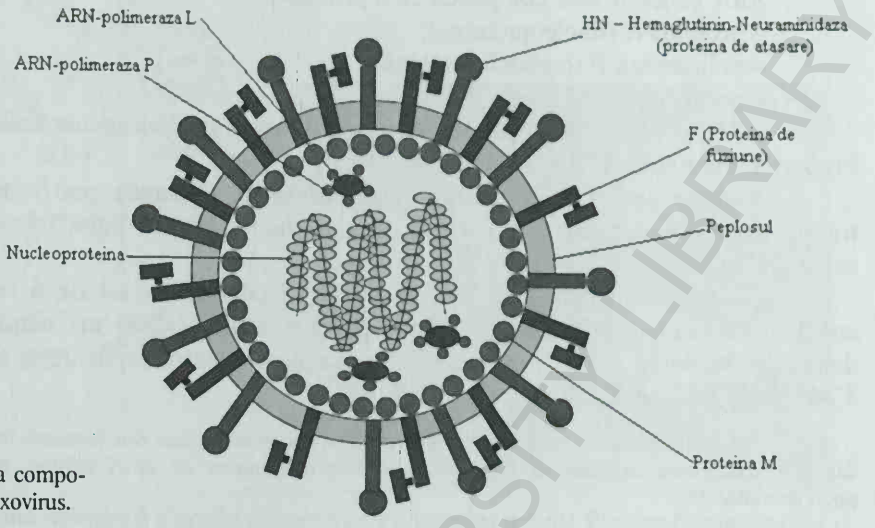


Fig. 394. Ilustrarea schematică a componentelor structurale ale unui paramixovirus.

Virusurile cu genom ARN monocatenar de polaritate negativă (*Mononegavirales*: *Paramyxo-Rhabdo-* şi *Filoviridae*) au o trăsătură morfologică generală şi anume *aspectul scămos* al suprafeţei, datorat prezenţei spiculilor glicoproteici care mediază ataşarea şi pătrunderea lor în celulă.

Prin tehnica coloraţiei negative pentru microscopia electronică, învelişul viral se rupe şi eliberează nucleocapside filamentoase helicale sau colorantul pătrunde prin peplos şi evidenţiază conturul nucleocapsidei.

Aspectul sferic al virionilor derivă din faptul că în nucleocapsidă, capsomerele realizează interacţiuni laxe, ceea ce permite un grad ridicat de flexibilitate a acesteia. Fiecare unitate de structură a nucleocapsidei este flexibilă. Polipeptidul fiecărei capsomere are *două domenii*: N-terminal, ce cuprinde 2/3 ale moleculei şi are *raporturi directe cu ARN genomic*; domeniul C-terminal, orientat spre *suprafaţa nucleocapsidei*. Zona de joncţiune a celor două domenii, sensibilă la proteaze funcţionează ca o 'articulaţie' (balama), la nivelul căreia *molecula se deformează* şi dobândeşte o altă configuraţie spaţială. Zona 'balama' este sensibilă la acţiunea tripsinei. Datorită flexibilităţii fiecărei capsomere, nucleocapsida se împachetează în interiorul învelişului.

Glicoproteinele de înveliş mediază ataşarea virionilor de celulele sensibile.

Hemaglutinina este o glicoproteină cu *orientare membranară de tip II*. Capătul $-NH_2$ este ancorat în citoplasma celulei, iar capătul C-terminal se extinde în spaţiul extracelular. Are o mare afinitate pentru acidul *sialic* din glicoproteinele membranei celulare, care au rol de receptor. Ataşarea virionilor pe eritrocite se face cu afinitate suficient de mare pentru a produce *hemaglutinarea*. Aceiaşi proteină poate avea şi activitate *neuraminidazică* şi de aceea se numeşte *hemaglutinin-neuraminidază (HN)*.

Proteina de fuziune (F) are rolul de a media fuziunea învelişului lipoproteic viral, cu suprafaţa lipoproteică a membranei celulare în procesul infecţiei. Se găseşte pe suprafaţa virionilor tuturor reprezentanţilor familiei. Se sintetizează ca o proteină precursoare inactivă de 540–580 aminoacizi (F_o), dar ulterior este clivată în două subunităţi – F_1 (mai mare) şi F_2 – ce rămân legate prin punţi S-S. Pentru ca învelişul viral să fuzioneze cu membrana citoplasmatică, este necesară cooperarea HN şi a proteinei F. După ce interacţionează cu receptorul celular, proteina H îşi schimbă configuraţia şi expune peptidul F. Concomitent cu fuziunea, nucleocapsida virală este eliberată în citoplasmă. Nucleocapsida paramixovirusurilor nu se dezasamblează natural: genomul este transcris şi replicat în interiorul nucleocapsidei. ARN împachetat strâns, datorită flexibilităţii capsomerelor, rămâne accesibil polimerazelor virionului, care transcriu catena de polaritate negativă în mesagerii complementari, înainte de dezagregarea capsidei.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE

Suprafața internă a învelișului este tapetată cu o proteină neglicozilată, *proteina M* (matriceală), cu rol în recunoașterea specifică între proteina N a nucleocapsidei și glicoproteinele de înveliș, în procesul asamblării.

ARN genomic este complexat cu 3 proteine:

– proteina *N* (*n*ucleoproteina);

– polimeraza *P* (o *p*hosfoproteină);

– polimeraza *L* (*L*arge).

ARN și proteina N (2600 molecule) formează nucleocapsida helicală, rezistentă la nuclează. Proporția proteinelor L/P este de 30/300.

Acțiunea celor 2 polimeraze este *sinergică*, deoarece purificate, nici una nu catalizează transcrierea. Polimerazele au și rolul de a *prelucra* ARNm după transcriere, adăugând poli-A la capătul 3' și metil 7-G la capătul 5'.

Genomul are o lungime de 15–16 kb și conține un set de 6 sau mai multe gene*, legate covalent în tandem. Genomul conține secvențe scurte (<100 nt) netraduse la capetele 3' și 5', denumite 'leader și trailer', cu elemente promotoare pentru replicare și transcriere. Ordinea genelor 3'–5': N, P/V/C, M, F, H/HN, L.

* Termenul de genă se referă la secvența de ARN genomic care este transcris într-o singură moleculă de ARNm, dar prin schimbarea cadrului de citire și datorită evenimentelor de ARN editing, genele P, M, F codifică și alte tipuri de molecule.

Gena N codifică nucleoproteina (proteina majoră a virionului). Fiecare moleculă N se asociază cu 6 nucleotide; circa 13 molecule N formează un tur de spiră a helixului. Cea de a II-a genă (P), la *Morbillivirus*, codifică 3 proteine cu rol în transcriere și în controlul imunității înnăscute : P, V, C.

Genele 3,4,5 codifică proteinele de înveliș: M, H/HN, F, iar gena 6 codifică proteina L (ARN-pol). Proteina M este localizată sub stratul lipidic, nefiind o proteină membranară și are rol în asamblarea vironilor.

Proteina F, un trimer, este activată prin clivare de furină, o protează ubicvitară în celule și mediază fuziunea peplosului viral cu membrana celulei. Fuziunea este necesară atât pentru pătrunderea virusului în celulă, cât și pentru diseminarea prin fuziune, care duc la formarea sincițiilor. Activitatea fuzionantă a proteinei F este dependentă de proteina H/HN, ce recunoaște un receptor membranar.

Genomul este nesegmentat și permite o variație genetică și antigenică limitată, mult mai restrânsă decât a virusurilor influenza. Nu se face reasortare genomică, iar variabilitatea este restrânsă la *modificările mutaționale*.

Cei mai mulți virioni ai unui preparat conțin o catenă de *ARN de polaritate negativă*, dar în capsidă pot fi incluse și catene de *polaritate pozitivă*. De aceea, în timpul izolării ARN se pot produce asocieri de catene. Preparatele virale obținute prin infecția substratului celular cu o doză mare de inocul, conțin o proporție mare de *virioni defectivi*, fără genom. Defectivitatea se datorează unor erori de replicare a ARN genomic.

Ciclul de multiplicare la mononegavirale (Paramyxo-, Rhabdo-, Filoviridae)

Proteinele învelișului (HN, H sau G) mediază atașarea virionilor de membrana celulei sensibile, la nivelul *glicoproteinelor* sau *glicolipidelor* care conțin *acid sialic*. HN fixează virionul pe receptor, dar are și activitate NA, adică clivează resturile de acid sialic ale receptorilor. Cele 2 activități sunt co-localizate într-un singur situs, cu 2 stări conformaționale distincte.

Nucleocapsida cu proteinele auxiliare (enzimele de transcriere) este eliberată în citoplasmă prin procesul fuziunii mediat de proteina F a învelișului viral, cu membrana celulei. Toate stadiile multiplicării virale se desfășoară în citoplasmă.

Catena de ARN genomic are polaritate *negativă*. Virionul conține polimerazele funcționale *L* (*L*arge) și *P*, ce catalizează transcrierea și replicarea ARN genomic: proteinele L (*Large*) și P (*Phosphoprotein*), cu funcție polimerazică (fig. 395).

ARN-polimerazele virale dependente de ARN inițiază transcrierea mesagerilor la capătul 3' al moleculei genomice, în citoplasmă, fără să necesite primeri exogeni. Complexul de transcriere

bonetează capătul 5', metilează şi poliadenilează capătul 3' al moleculelor de *ARNm.* Mesagerii sunt *monocistronici,* fiecare genă fiind transcrisă într-o moleculă distinctă de ARNm.

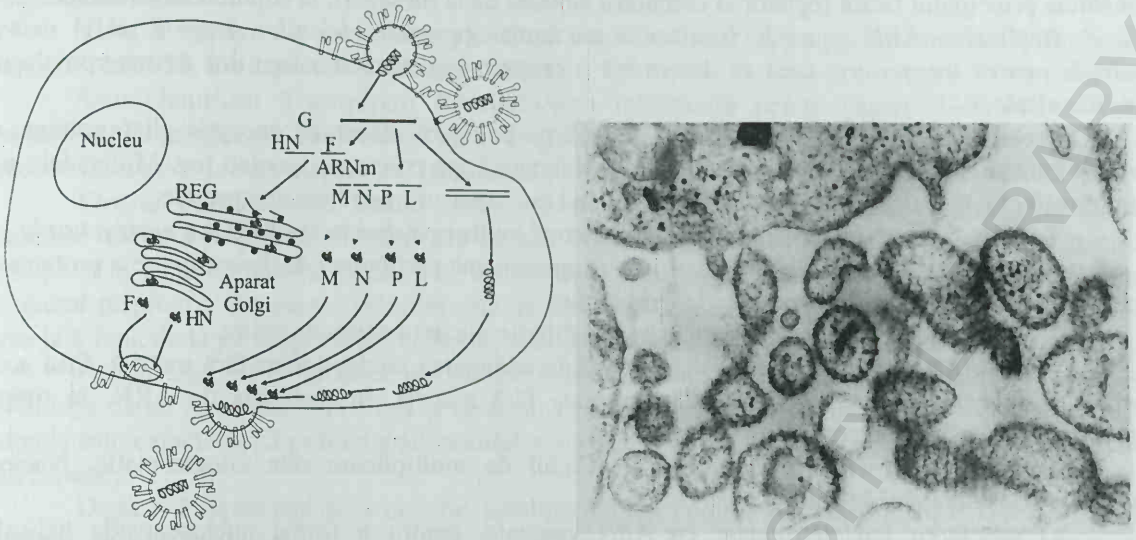


Fig. 395. În stânga, reprezentarea schematică a *ciclului de multiplicare a virusului rujeolic.* Proteina F se asociază cu microdomenii membranare (pontoane lipidice) şi atrage proteinele H la situsurile la care virusul va înmuguri. Genomul ARN nascent se asociază cu proteina N şi formează nucleocapsida. Proteinele P şi L se asociază cu nucleocapsida în aria perinucleară. Proteina M se asociază atât cu nucleocapsida în citoplasmă, cât şi cu glicoproteinele virale rezidente în membrana citoplasmatică. Nucleocapsidele progene se agregă în zonele modificate ale membranei şi înmuguresc. În dreapta, *imagine electrono-optică a virionilor rujeolei.* La locul agregării proteinei M, membrana devine electrono-densă şi uşor deformabilă. Nucleocapsida înmugureşte într-o structură veziculară – virionul. Virionii au dimensiuni diferite, ceea ce reflectă absenţa controlului riguros al morfogenezei. În membrana celulelor infectate se inseră o cantitate mare de glicoproteine virale, ceea ce le conferă capacitatea de aderenţă de celulele adiacente, iar proteina F favorizează fuziunea şi formarea celulelor gigante multinucleate, x 120.000, original.

Forma de replicare dublu catenară, funcţionează alternativ cu rol de matriţă, atât pentru *transcrierea ARNm* cât şi pentru *sinteza replicativă a ARN.* Ambele activităţi sunt catalizate de ARN-polimerazele virale. Enzimele recunosc acelaşi promotor la capătul 3' al genomului complexat cu nucleoproteina şi progresează spre capătul 5'.

Diferenţa dintre transcriere şi replicare este determinată de modul în care polimerazele progresează pe matriţa ribonucleoproteică: *secvenţial* sau *continuu.*

Pentru *transcriere, ARN-polimeraza* recunoaşte *semnalele scurte de start şi de stop,* care delimitează cistronii. Transcrierea *se opreşte şi procesul se reiniţiază* la fiecare joncţiune genică.

După fiecare semnal stop, transcrierea este reluată cu o rată mai scăzută, de la semnalul *start* al cistronului următor. De aceea, rata transcrierii ARNm dintr-un cistron este proporţională cu poziţia sa faţă de capătul 3' al genomului, scăzând progresiv faţă de punctul de iniţiere. Transcrierea este independentă de funcţiile nucleului şi progresează chiar în prezenţa *actinomicinei D* (inhibitor al transcrierii ADN-ARN) şi a inhibitorilor sintezei proteice. Se sintetizează ARNm pentru proteinele N, P, G, M, L.

Replicarea ARN semnifică sinteza unor molecule întregi. Activitatea de *replicază* a polimerazei progresează *continuu,* pe forma de replicare dublu catenară, folosind ca matriţă catena anti-genomică cu polaritate pozitivă. Se sintetizează catene genomice, cu polaritate negativă.

Catenele genomică şi antigenomică funcţionează ca matriţe după ce se complexează cu nucleoproteina, pentru a fi protejate de acţiunea nucleazei. De aceea, sinteza nucleoproteinei este necesară, atât pentru transcriere, cât şi pentru replicare.

Comutarea de la transcriere la replicare este condiţionată de cantitatea de *nucleoproteină. Nivelul scăzut al nucleoproteinei orientează activitatea ARN-polimerazei în sensul transcrierii ARNm.*

Creşterea cantităţii de nucleoproteină, ca rezultat al traducerii mesagerilor săi, induce inactivarea semnalelor de stop şi start şi astfel comută sinteza ARN de la transcrierea discontinuă a mesagerilor, la *copierea continuă a matriţei* şi sinteza copiilor antigenomice. În esenţă,

ARN-polimeraza nu mai recunoaşte semnalele cistronice de start şi stop. Se sintetizează de 6 ori mai multe catene genomice decît catene de polaritate pozitivă. Astfel, disponibilitatea proteinei N pare să constituie principalul factor reglator al comutării sintezei de la mesageri, la copiile antigenomice.

Replicarea ARN genomic furnizează nu numai *genomul virionilor progeni*, ci şi *matriţe multiple pentru transcriere*, ceea ce determină o creştere logaritmică a tipurilor de macromolecule specific virale.

Proteinele virale se sintetizează în citosol, pe polisomii liberi, cu excepţia glicoproteinei de înveliş, care se sintetizează ca o proteină transmembranară, pe polisomii asociaţi reg. Moleculele sale sunt transferate pe calea cisternelor Golgi, la nivelul unor situsuri membranare speciale.

Toate paramixovirusurile codifică una sau mai multe proteine mici (20 kDa), *nestructurale*.

Membrii subfamiliei *Paramyxovirinae* au mecanisme particulare de diversificare a proteinelor codificate, fără să mărească dimensiunile genomului:

– *ribosomii iniţiază traducerea* la situsuri diferite ale unui cadru de citire;

– *prin ARN "editing"*, proces care constă în adăugarea nucleotidelor fără matriţă. Prin acest mecanism, bazele (în special G) sunt încorporate fără matriţă, în molecula de ARN, în timpul transcrierii, diversificând copiile şi produsele lor.

Asamblarea şi eliberarea virionilor. Ciclul de multiplicare este citoplasmatic. Nucleocapsidele se asamblează în două etape:

a) *asocierea nucleoproteinei cu ARN genomic*, pentru a forma nucleocapsida helicală, rezistentă la nuclează, la care se adaugă ulterior proteinele P şi L şi rezultă ribonucleoproteina. Componenta majoră a nucleocapsidei – *proteina N* – are rol esenţial în procesul asamblării virionului, deoarece interacţionează cu proteina M şi se asociază cu polimerazele;

b) *asamblarea învelişului viral se face la suprafaţa celulei*. Situsurile membranare la nivelul cărora are loc înmugurirea se modifică în ceea ce priveşte conţinutul glicoproteinelor. Proteinele virale de înveliş, glicozilate la nivelul cisternelor reticulului endoplasmic şi a aparatului Golgi înlocuiesc glicoproteinele celulare inserate în stratul lipidic al membranei plasmatice. *In vivo*, glicoproteinele virale sunt orientate spre suprafaţa apicală a celulelor endoteliale, dar pentru alte virusuri învelite, glicoproteinele sunt orientate spre suprafaţa bazală. Ulterior, proteina M se agregă pe faţa internă a învelişului nascent, prin interacţiuni necovalente. Nucleocapsida recunoaşte proteina M şi la nivelul acestor situsuri are loc înmugurirea din membrana citoplasmatică.

NA, a cărei activitate rezidă în spiculele HN are acelaşi rol ca şi NA de la virusul influenza – de a desializa glicoproteinele virale – pentru prevenirea agregării virionilor.

ECP. Pe măsura progresiei ciclului de multiplicare, membrana celulei se încarcă cu spiculi glicoproteici. Dacă în mediu se găsesc enzime de tipul tripsinei, moleculele F_0 se activează şi mediază *fuziunea* cu celulele învecinate. Este fenomenul *fuziunii din interior*, care permite diseminarea infecţiei de la o celulă la alta, evitând contactul cu anticorpii. *In vitro*, infecţia cu o doză mare de virus produce fuziunea înainte de multiplicarea virală (*fuziunea din exterior*). Fuziunile intercelulare pot să implice un număr mare de celule şi se formează sinciţii, atât *in vitro*, cât şi *in vivo*.

În sinciţii multiplicarea continuă, se eliberează virus progen şi celulele se lizează.

Celulele mezenchimale, în general, sunt *rezistente* la liză. S-au raportat numeroase cazuri de infecţii persistente, *in vitro*, ale celulelor mezenchimale (Şorodoc şi Mihăescu, 1980).

Multiplicarea virusului rujeolic nu inhibă metabolismul celulei, dar liza, uneori rapidă, survine datorită formării sinciţiilor prin fuziune.

Modificările citogenetice includ ruperi cromosomale multiple, o adevărată pulverizare, în special în sinciţii, datorită condensării premature a cromatinei în nucleii sinciţiilor.

Epidemiologie. Infecţiile se transmit pe cale respiratorie, prin intermediul aerosolilor contaminaţi. Nu există vectori. Nu infectează plantele.

g. ***Paramyxovirus*** infectează omul şi alte specii de mamifere şi păsări.

S-au identificat 5 tipuri antigenice (serologice) de *Paramyxovirus*, infecţioase pentru om, maimuţă, câine, oaie, şoarece), denumite *Parainfluenza 1, 2, 3, 4A* şi *4B*. *Parainfluenza 2* infectează şoarecele (*virus Sendai*). In clasificarea nouă, virusurile *Parainfluenza* 1 şi 3 au fost incluse în g. *Respirovirus*, iar *Parainfluenza* 2 şi 4, în g. *Rubulavirus*, ca şi virusul oreionului. Cele două

genuri, împreună cu *Morbilivirus* fac parte din subfamilia *Paramyxovirinae*, iar subfamilia *Pneumovirinae* include g. *Pneumovirus* cu virusul respirator sincițial (VRS) și g. *Metapneumovirus*, recent izolat de la om.

Virusul Sendai s-a izolat din plămânul unui nou născut cu pneumonie fatală în Sendai (Japonia), în 1953, dar este considerat virus murin.

S-au identificat 9 serotipuri *Parainfluenza*, infecțioase pentru păsări (1–9) incluse în g. *Avulavirus*. *Parainfluenza* 1 infectează puiul de găină și se numește *virusul bolii Newcastle* (NDV), ce produce infecții de la cele inaparente, până la cele viscerale letale.

Virusul parainfluenza uman (HPIV) se transmite prin inhalarea aerosolilor eliberați din secrețiile tractului respirator sau din cele nazale. Perioada de incubație este de 2–8 zile. Virusul se multiplică în epiteliul nazofaringian și se disemineză în arborele traheobronșic. Se multiplică numai în tractul respirator. Recurența infecției este un fenomen comun. HPIV se poate izola o perioadă de până la 8 luni, de la pacienții izolați complet, ceea ce sugerează eliberare prelungită.

Patogeneza. HPIV produce pneumonie și bronșiolită, mai ales la copiii de până la doi ani, cu inflamația căilor respiratorii, necroză și descuamarea epiteliului, edem, sinteza în exces a mucusului. Infecția este caracterizată prin edemul coardelor vocale, al laringelui, traheii, bronhiilor, cu obturarea căii aeriene.

După 1–2 săptămâni de la infecție, serul pacienților conține Ac anti-HN, N, P, F și anti-M. HN pare a fi cea mai imunogenă.

HPIV se izolează din secrețiile tractului respirator. Secrețiile sau tamponul faringian se resuspendă în 2 ml mediu de creștere cu 10% ser fetal de vițel, în care infecțiozitatea virusului se păstrează. Suspensia se centrifughează la 2000 g (10 min.) pentru depunerea bacteriilor contaminante și a celulelor descuamate. Supernatantul se inoculează pe cultură de fibroblaste umane sau pe culturi primare de rinichi de maimuță. Multiplicarea virusului în cultură se identifică prin capacitatea sa de a induce fenomenul de *hemadsorbție*. După îndepărtarea mediului nutritiv, monostratul de celule se acoperă cu suspensie eritrocitară de cobai sau de cocoș. Hemadsorbția se observă la microscopul optic.

g. ***Pneumovirus*** (*pneuma*, lb. greacă = respirație) cuprinde *virusul respirator sincițial* (VRS) uman și bovin, *virusul pneumoniei* șoarecelui, *virusul rinotracheitei* la curci. S-au identificat două grupe antigenice: A și B.

VRS de grup A are 15 122 nucleotide și codifică 11 proteine din mesageri monocistronici, cu excepția ARN M_2, care codifică proteinele $M_{2\text{-}1}$ și $M_{2\text{-}2}$. In structura virionului se găsesc 8 proteine (L, G, F, N, P, M, $M_{2\text{-}1}$ și SH), alte două sunt nestructurale (NS_1 și NS_2), iar $M_{2\text{-}2}$ are rol reglator. In structura capsidei intră 3 proteine (N, P, L), două sunt componente ale matricei (M și $M_{2\text{-}1}$, neglicozilate), iar alte 3 sunt inclavate în peplos (F, G glicozilate și proteina SH neglicozilată). Proteina F mediază fuziunea peplosului viral cu membrana celulei sensibile, iar proteinele G și SH stimulează procesul fuziunii.

VRS a fost izolat de la cimpanzeu. Este ubicvitar, fiind agentul patogen major al infecției respiratorii acute la copiii mici (sub un an), unde produce cel mai tipic tablou patologic al paramixovirusurilor.

Epidemiologie. VRS este foarte infecțios. Epidemiile apar anual în regiunile temperate, în sezonul rece. La copiii mai mici de 3 ani, infecția primară se extinde în tractul respirator inferior și este cea mai severă în primele 6 luni de viață. Toți copiii se infectează în primii 3 ani de viață. La copiii imunodeficitari, infecțiile sunt grave și implică plămânul. Reinfecțiile apar în tot cursul vieții.

Perioada de incubație este de 3–6 zile, cu variații între 2–8 zile. Virusul pătrunde prin tractul respirator superior, se multiplică și infecția progresează descendent și produce bronșiolită /pneumonie, deoarece virusul maturat prin înmugurire este înglobat prin fuziune cu membrana celulei învecinate.

Patologie. Tabloul clinic caracteristic al infecției cu VRS la copilul mic este *bronșiolita*, care constă în inflamația peribronhiolară cu leucocite, iar mucoasa și adventicea sunt edematoase. Leziunile progresează la necroză, cu desprinderea epiteliului alveolar, ce poate fi asociat cu răspunsul proliferativ al epiteliului. Obturarea bronhiolelor cu celulele epiteliale descuamate și cu exudatul inflamator duce la obturarea parțială a tranzitului aerului, semnul clinic distinct al

bronşiolitei. Lumenul îngust al căilor aeriene ale copilului este predispus la obstrucţie* şi la secreţia crescută de mucus.

* Dacă lumenul bronhiolelor este incomplet obturat, aerul se opreşte distal (în aval) faţă de locul ocluziei parţiale. Asemenea unui mecanism al balonului cu valvă, trecerea aerului este mai uşoară în timpul inspiraţiei (datorită presiunii negative), dar în expiraţie, la creşterea presiunii pulmonare, lumenul căii se îngustează, producând obstrucţia mai accentuată sau completă a căii aeriene. Aerul blocat produce creşterea volumului pulmonar, caracteristică bronşiolitei, asociată cu hipoxia de diferite grade. Resorbţia manifestărilor patologice poate avea loc în câteva săptămâni. Epiteliul bronhiilor începe să se regenereze în 3–4 zile, dar celulele ciliate ale bronhiilor se refac în mai mult de 2 săptămâni. Schimbările patologice ale bronşiolitei progresează sau coexistă cu acelea ale pneumoniei, când ţesutul interstiţial se infiltrează cu mononucleare care colapsează alveolele şi accentuează hipoxia.

Răspunsul imun înnăscut se caracterizează prin sinteza chemokinelor şi citokinelor proinflamatorii. Chemokinele sunt atractante pentru neutrofile, eozinofile şi NK ce produc IFNγ. Infecţia primară induce sinteza IgM, apoi a IgG, în a II-a săptămână de la infecţie. Titrul Ac scade după 1–2 luni. Anticorpii sunt specifici anti-F şi anti-G, ambele glicozilate (în special G) şi din această cauză, slab imunogene pentru copii.

RIMC este esenţial pentru evoluţia infecţiei. Copiii şi adulţii cu deficit al IMC fac infecţii severe cu VRS, indiferent de intensitatea RIMH. Răspunsul imun faţă de Ag VRS variază în funcţie de calea de activare: Th_1 sau Th_2. Răspunsul imun dominat de celulele Th_1 este asociat cu controlul infecţiei şi sterilizarea focarului, fiind caracterizat prin stimularea TCD_4 ce secretă IFN şi a limfocitelor TCD_8 ce secretă IL-2, IFNγ şi IFNα. Răspunsul dominat de Th_2 este caracterizat prin activarea celulelor TCD_4 care eliberează IL-4, 5 şi IL-13, infiltrarea plămânului cu eozinofile şi sinteza IgE, iar clinic, prin hiperreactivitatea căilor respiratorii şi infecţie severă. Raportul dintre cele două subpopulaţii de CD_4 este influenţat de vârstă, de factorii genetici, de modul de prezentare a Ag virale.

Boala Croup semnifică inflamarea coardelor vocale, cu obturarea respiraţiei, ceea ce impune traheotomia.

La adult, infecţia produce o răceală comună. Multe infecţii sunt asimptomatice, dar se pot exacerba la cei cu bronşită cronică şi la fumători. Infecţiile sunt limitate la poarta de intrare (epiteliul căilor aeriene superioare).

Diagnosticul infecţiei se face prin izolarea virusului, sau diagnosticul rapid prin tehnici moleculare. Virusul se izolează pe celulele HEp-2, unde ECP apare în 3–5 zile. Alte teste pentru detectarea Ag virale au avantajul rapidităţii: EIA (enzyme immunosorbent assays); PCR este cea mai sensibilă şi specifică.

Pentru tratamentul bronşiolitei se administrează bronhodilatatoare, glucocorticoizi şi antibiotice. La adulţi se administrează ribavirina (un nucleozid sintetic ce interferă cu traducerea ARNm), sub forma aerosolilor, dar beneficiul este incert.

Nu există un *vaccin* eficient cu VRS. S-au obţinut mutante atenuate prin adaptare la rece (cold passage) şi prin mutageneză chimică pentru obţinerea mutantelor *ts*, ce se multiplică la 32–35° în tractul superior, dar nu la temperatura mai mare din tractul inferior. Mutantele tind să fie instabile genetic.

g. ***Rubulavirus*** produce oreionul. Virusul infectează glandele parotide, dar curând apare viremia şi infecţia devine sistemică cu diseminare viscerală. Complicaţiile care pot să survină sunt meningoencefalita, orhita, pancreatita, ooforita (infecţia ovarului), artrita, miocardita şi disfuncţia renală. Orhita la adult produce sterilitate, iar pancreatita poate să predispună la diabet insulino-dependent.

Virusul se poate izola din salivă, urină, LCR.

In vitro produce sinciţii gigante (fuziune).

Vaccinul oreionului este foarte eficient. Se folosesc tulpini atenuate, care protejează în proporţie de 95% pe cei vaccinaţi.

g. ***Morbillivirus*** (*morbili*, lb. latină, este pluralul de la *morbilus*, diminutiv de la *morbus* = boală) cuprinde virusul rujeolei, virusul jigodiei (distemper) canine (virusul bolii Carré), virusul pestei bovinelor (rinderpest) înrudite genetic şi antigenic.

Raporturile strânse sunt reflectate de faptul că virusul rujeolei, inactivat, imunizează câinele față de virusul bolii Carré. Virusul rujeolei produce *infecții cu exantem* (rash), adică *erupție veziculară eritematoasă*, cu complicații rare la nivelul SNC și aparatului respirator.

Caracteristicile definitorii ale g. *Morbillivirus* sunt absența activității NA și legarea de receptorul SLAM (o moleculă semnal a activării limfocitelor).

Gena P codifică 3 proteine: P, V, C. Proteina P este componenta esențială a ARN-pol. Proteina V are rolul de a contracara RI înnăscut, pentru că interferă cu calea de semnalizare intracelulară ce declanșează răspunsul celulei la IFN și astfel favorizează diseminarea virusului în SI al gazdei. Proteina C inhibă răspunsul celulei la IFN și este, ca și proteina V, un factor de virulență.

Morbillivirus nu utilizează acidul sialic și proteina H nu are activitate NA. Receptorul celular este SLAM, a cărei expresie este limitată la celulele SI (este constitutivă pe timocitele imature, pe celulele T de memorie, pe unele celule B). Monocitele și CD exprimă SLAM numai după activare (Cattaneo și colab., 2008).

Rujeola este o maladie foarte contagioasă, specifică omului. Virusul nu are rezervor natural. Rujeola este o infecție a copilăriei și pentru ca virusul să se mențină este necesară o populație de câteva sute de mii de indivizi, în care să apară noi susceptibili, pentru că infecția este însoțită de o imunitate protectoare solidă pentru tot restul vieții.

Virusul se transmite prin aerosoli contaminați, eliminați prin vorbire, tuse, strănut. Perioada de incubare este de 7–10 zile. Infecția se inițiază când virusul ajunge pe *celulele epiteliale* ale tractului respirator, în orofaringe sau pe conjunctivă, unde produce o infecție acută. Timp de 2–4 zile, virusul se multiplică local în mucoasa respiratorie, trece în sânge și produce *viremia primară*. Limfocitele îl transportă în organele limfoide secundare (în ganglionii limfatici), unde se desfășoară ciclul de multiplicare *secundară*. De aici trece în sânge și determină *viremia secundară*, mai intensă, în cursul căreia virusul este diseminat sistemic, în celulele *endoteliului vascular* și rezultă o infecție generalizată acută. Virusul se multiplică în *celulele endoteliale* ale vaselor mici.

Infecția celulelor endoteliale este însoțită de dilatarea vaselor, infiltrarea perivasculară a mononuclearelor, creșterea permeabilității vasculare, edem, ceea ce determină erupția tegumentară. Sunt infectate vasele mici ale dermului superficial, capilarele conjunctivei, ale mucoasei orale și faringiene, ale laringelui, traheii, bronhiilor, capilarele alveolare și meningeale, ale tractului intestinal, vasele mici din splină, timus, ganglionii limfatici, formațiunile limfoide asociate mucoaselor.

Răspunsul imun. Răspunsul imun primar este caracterizat prin sinteza IgM și activarea IMC (celulele CD_4 de tip 1 și CD_8). Rolul limfocitelor T în eliminarea infecției cu virus rujeolic este esențial. La copiii cu reactivitate imunitară normală, infecția produce erupția caracteristică.

La copiii cu deficit funcțional al celulelor T, infecția este adeseori fatală. Erupția veziculară eritematoasă (rash) este mediată de celulele T și la copiii imunodeficitari sau imunosupresați nu se produce. Erupția tegumentară este indicatorul evoluției favorabile a infecției.

La copiii hipo- sau agamaglobulinemici, erupția se produce și evoluția infecției este nealterată de absența Ac. Se instalează IMC de memorie, iar anticorpii nu sunt esențiali pentru controlul infecței primare și nici pentru răspunsul secundar (de memorie).

Patologie și histopatologie

Infecția rujeolică determină mortalitatea a circa 20% dintre copiii subnutriți, cu vârsta sub 5 ani. Cauza morții este, de obicei, infecția bacteriană pulmonară secundară datorată *imunosupresiei* consecutive infecției rujeolice. Imunosupresia durează câteva luni și constă în diminuarea funcției celulelor T și B, scăderea imunității celulare, asociată cu creșterea sensibilității la tuberculoză. Imunosupresia este consecința faptului că virusul rujeolei infectează celulele dendritice, dar nu se cunoaște mecanismul scăderii reactivității celulelor T.

Virusul infectează celule de origine ectodermică, endodermică și mezodermică. Semnul histopatologic distinct al infecției cu virusul rujeolei este formarea *sincițiilor*, celule gigante multinucleate mediate de proteina F, ce se observă pe secțiunile histologice în organele limfoide, în plămân, în epiteliul columnar al traheii, în epiteliul squamos stratificat al tegumentului și mucoasei bucale, în epiteliul de tranziție al vezicii urinare și uretrei și chiar în endoteliul arterelor pulmonare mici. Sincițiile generate de limfocite, macrofage, CD sau de celulele reticulare, sunt sediul

multiplicării virale şi se lizează pe măsură ce virusul este eliminat de efectorii imunitari. Patologia infecției se datorează inflamației şi lizei celulare, urmată de reparare tisulară fără fibroză. Infecțiile bacteriene secundare sau cu alte virusuri sunt comune.

Infecții persistente. Virusul *rujeolic* produce, de obicei, o infecție acută şi autolimitată. De cele mai multe ori, după infecția acută, organismul se sterilizează, iar memoria imunitară se păstrează tot restul vieții.

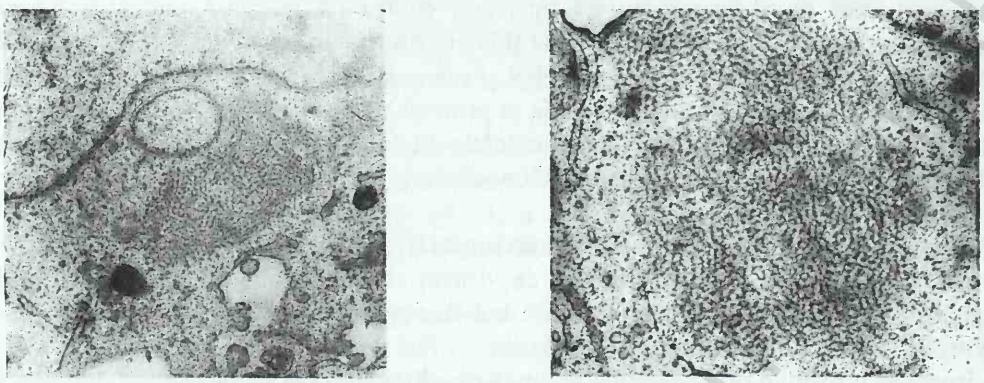


Fig. 396. Infecția persistentă a celulelor de rinichi de viței, cu virusul rujeolic. În celulele infectate persistent, asamblarea şi eliberarea virionilor prin înmugurire sunt procese limitate, datorită unui deficit cantitativ al proteinei M. Proteina N se asociază cu molecula de ARN genomic şi formează nucleocapside care se acumulează şi formează incluzii citoplasmatice în aria perinucleară. În stânga, nucleocapsidele filamentoase perinucleare. În dreapta, detaliu al incluziei cu nucleocapside filamentoase, x 47.000, respectiv 135.000 (original).

Imunodeficiențele primare şi secundare ale IMC constituie riscuri majore pentru persistența infecției în tractul respirator inferior şi în SNC. Deficiența IMH nu influențează controlul multiplicării virusului. În țesutul pulmonar, persistența duce la *pneumonia cu celule gigante.*

În faza viremiei secundare, probabil virusul *pătrunde în SNC*, prin infecția capilarelor meningeale, a membranei piamater sau a plexurilor coroide. Cu o frecvență mare, virusul rujeolic determină *infecții persistente ale neuronilor* asociate cu maladii neurologice: encefalita post-infecțioasă acută cu corpi de incluzie şi rareori, *panencefalita sclerozantă subacută* (*PESS*). PESS este o afecțiune rară a adulților tineri, caracterizată prin demielinizare progresivă, lentă a SNC, cu sfârşit letal. O altă complicație este encefalomielita acută demielinizantă, asociată cu reacția autoimună față de mielină.

În neuroni şi în celulele gliale infectate s-a detectat un număr mare de nucleocapside, iar titrul anticorpilor în lichidul cefalorahidian este crescut. Genele care codifică sinteza proteinelor de înveliş sunt exprimate puțin sau deloc. Neuronul este o celulă nepermisivă pentru multiplicarea virusului rujeolic. Neuronii infectați sintetizează cantități mici de proteină M şi nu expun glicoproteinele virale pe suprafața lor. Virusul nu înmugureşte. Nu se eliberează virus progen (infecție persistentă neproductivă). Neuronii infectați evită acțiunea celulelor citotoxice prin fenomenul *modulației antigenice**, ce constă în diminuarea cantitativă a antigenelor expuse la suprafața celulei în prezența anticorpilor specifici.

* Fenomenul modulației antigenice a fost evidențiat i*n vitro*, prin adăugarea anticorpilor specifici față de virusul rujeolic, marcați cu fluorocromi, în mediul de creştere a celulelor infectate (neuroni şi limfocite). Se produce redistribuirea şi bonetarea glicoproteinelor virale expuse pe suprafața celulelor, urmată de eliminarea lor sub forma complexelor cu anticorpii. Celula modulează cantitatea antigenelor expuse la suprafață, diminuând cantitatea lor şi devine rezistentă la acțiunea efectorilor imunitari. Modularea antigenică indusă de anticorpi are o semnificație biologică mai largă, în sensul că reprezintă un mecanism prin care celulele purtătoare de antigene (virale sau tumorale) pot să-şi reducă semnificativ cantitatea de molecule nonself exprimate pe suprafață, evitând astfel acțiunea mecanismelor de supraveghere imunitară.

Semnele clinice ale PESS apar la circa 7 ani după infecția rujeolică. Disfuncțiile SNC se intensifică treptat: apar tulburări psihice, de comportament, deteriorarea progresivă a funcțiilor intelectuale, paralizia. Moartea survine la 6 luni–3 ani de la declanşare.

Profilaxia. Pentru controlul infecțiilor cu virusul rujeolei şi al oreionului se produc vaccinuri *atenuate.* Cele două vaccinuri se administrează asociat, pe cale orală şi induc sinteza sIgA protectoare. Administrarea parenterală nu este protectoare.

Virusurile *Parainfluenza* 1–4 şi VRS nu sunt controlate prin vaccinare, pentru că proteinele lor de suprafaţă sunt slab imunogene. Formolul inactivează imunogenitatea proteinei F şi organismul rămâne neprotejat faţă de diseminarea virusului prin fuziune.

Bibliografie

Lamb R. A., Kolakofsky D. 1996. *Paramyxoviridae* : The Viruses and Their Replication, în vol. Fields Virology, third Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.

Kingsbury D. W. *Paramyxoviridae* and Their Replication, în vol. Fundamental Virology, Second Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Pringle C. R., Heath R. B. 1990. *Paramyxoviridae*, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Chanock R. M., McIntosh K. 1990. *Parainfluenza* Viruses, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al, Raven Press, Ltd., New York.

Norrby E., Oxman M. N. 1990. Measles Viruses, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al, Raven Press, Ltd., New York.

Malvoisin E., Fabian Wild T. 1993. Measles Virus glycoproteins: studies on the structure and interaction of the haemagglutinin and fusion proteins – Journal of General Virology, 74, 2365–2372.

Henrickson K. J. 2003. *Parainfluenza* Viruses – Clin. Microbiol. Rev. 16, 242–264.

Vainionpaa R., Hyypia T. 1994. Biology of *Parainfluenza* Viruses – Clin. Microbiol. Reviews 7, 2, pp. 265–275.

Psarras S., Papadopoulos N. G., Johnson S. L. 2004. *Parainfluenza* Viruses, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Breese Hall Caroline 2004. Respiratory Syncytial Virus, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Breese Hall Caroline. 2009. Respiratory Syncytial Virus, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, sixth Edition, ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, Barry D. Schoub, Paul D. Griffith, Philip Mortimer, Wiley Blackwell, Johhn Wiley & Sons, Ltd.

Şorodoc Y., Mihăescu Gr., Cernescu C., Cajal N. 1980. Persistent measles virus infection in a calf kidney cell line. Electron microscopic observations in the K_2 cell line – Rev. Roum. Med. (Virol.) 31, 2, 125–130.

Carter J. B., Saunders V. A. 2007. Virology: Principles and Applications John Wiley & Sons, Ltd.

Cattaneo R., McChesney M. 2008. *Morbillivirus*, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

21.3. Familia Rhabdoviridae

Caracteristica definitorie a virionilor este forma alungită, de glonţ (*rhabdos*, grec = baston). Lungimea este variată, între 100 şi 430 nm, iar diametrul în secţiune, între 50–100 nm, cu excepţia unor virusuri ale plantelor, cu aspect baciliform. In preparatele virale, apar frecvent *virioni defectivi*, cu acelaşi diametru, dar lungimea este de numai 25–50% din cea normală. Compoziţia chimică a particulelor defective este aceiaşi, dar nu sunt infecţioase, deoarece genomul lor este cu 50–80% mai mic decât cel normal.

Reprezentanţii familiei *Rhabdoviridae* au cea mai largă răspândire în natură. S-au identificat peste 100 de variante virale, care infectează vertebratele (mamifere, reptile, peşti), crustaceele, plantele. Virusurile de importanţă clinică (agentul rabiei) şi economică (produc pierderi importante în piscicultură), infectează numai vertebratele. In general, rhabdovirusurile au un spectru larg de gazdă, unele fiind infecţioase atât pentru plante, cât şi pentru artropodele care le transmit. S-au identificat peste 70 de rhabdovirusuri infecţioase pentru vertebrate. Numărul celor infecţioase pentru plante pare a fi de ordinul sutelor, dar puţine dintre ele au fost identificate.

Cel mai adesea, rhabdovirusurile sunt transmise de *artropode*. Artropodele constituie rezervorul originar, din care s-au adaptat virusurile infecţioase pentru plante şi pentru vertebrate. Unele au cicluri mixte (artropod-plantă sau artropod-mamifer), ceea ce argumentează că la origine, aceste virusuri au fost infecţioase pentru artropode.

Rhabdovirusurile infecţioase pentru om şi alte mamifere au fost clasificate în două genuri: g. *Vesiculovirus*, cu reprezentantul tipic al familiei – virusul stomatitei veziculare (VSV) şi g. *Lyssavirus* (*lysa*, lb. greacă = furie), care include virusul rabic şi pe cele asemănătoare. Prototipul acestei familii este VSV, iar virusul rabic prezintă caracteres structurale şi funcţionale asemănătoare.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Structura (fig. 397). Virionul este alcătuit din două componente structurale majore: a) *nucleocapsida* ribonucleoproteică, formată prin asocierea intimă a *ARN genomic* cu *proteina* N, cu *fosfoproteina* (*P*) şi cu *ARN-polimeraza* (L). Ribonucleoproteina este împachetată în 35 de spire în virionul infecţios; proteina M tapetează faţa internă a peplosului; b) *învelişul*, reprezentat de un dublu strat lipoproteic, care acoperă nucleocapsida. Pe suprafaţa virionului proemină *spiculele glicoproteice* (G), de 8–10 nm, acilate cu acid palmitic. Fiecare spicul este un trimer al moleculei G, cu o protuberanţă terminală.

Componentele chimice ale virusului rabic sunt ARN (3–4%), proteine (67%, cu 3% glucide) şi lipide (26%). Lipidele derivă în totalitate din membrana celulară, dar sunt selectate în alte proporţii decât cele din membrana plasmatică. Diferenţa principală constă în proporţia mai mare de *colesterol*. Raportul cantitativ modificat al diferitelor categorii de lipide, conferă vâscozitate semnificativ crescută peplosului virionilor, comparativ cu a membranei celulare.

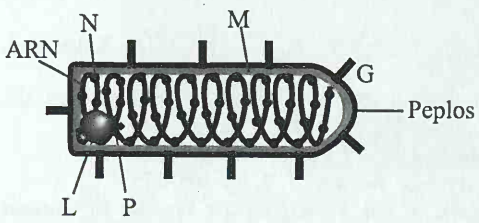


Fig. 397. Structura virionului rabic.

Virusul rabic are aceleaşi 5 proteine majore: N, P, L, M, G. Cea mai abundentă este *proteina N* asociată ARN genomic şi în celulele infectate formează incluziile Babeş-Negri. Proteina N, fosforilată, este formată din 450 aminoacizi, cea mai bine conservată la toate tulpinile de *Lyssavirus*. Moleculele sale se sintetizează în exces, se agregă în cursul sintezei sau se asociază cu proteina P într-o matrice filamentoasă şi formează *incluziile Babeş-Negri*.

Proteina P(fosfoproteina) pare să aibă funcţii multiple: se asociază cu proteina N, împiedicând polimerizarea ei; formează un complex cu proteina L, având rol în transcrierea şi în replicarea genomului; se asociază cu *dineina* (componentă a microtubulilor) şi are rol în transportul intracelular al nucleoproteinei virale. *Proteina L* (2142 aminoacizi, cea mai mare proteină a virionului) este *polimeraza* asociată genomului, cu rol de enzimă de transcriere, bonetare, metilare şi poliadenilare a ARNm.

Proteina M acoperă complexul ribonucleoproteic, iar *proteina G* formează spiculele proeminente ale învelişului, având rol de mediator al fuziunii peplosului cu membrana endosomului, favorizează trecerea virusului dintr-o celulă în alta, are rol în transportul axonal şi în tranzitul sinaptic. Anticorpii anti-G neutralizează infecţiozitatea virionilor. *Glicoproteina* G are activitate hemaglutinantă în condiţii foarte stricte de pH, concentraţie a sărurilor, temperatură. Eritrocitele de gâscă sunt substratul optim pentru hemaglutinare.

Genomul rhabdovirusurilor este o moleculă de ARN monocatenar nesegmentat, cu polaritate negativă, adică este transcris de ARN-polimerază în ARNm. ARN genomic este asociat cu nucleoproteina (proteina N, 422 aminoacizi) şi cu alte două proteine, minore din punct de vedere cantitativ: *P* şi *ARN-polimeraza L*. Genomul şi proteinele asociate constituie RNP, ce formează 35 de spire la virionii infecţioşi.

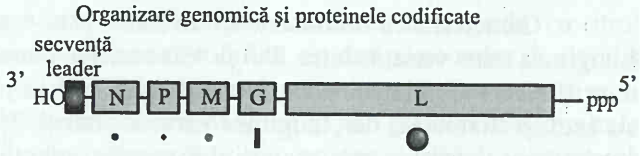


Fig. 398. Organizarea genomică a rhabdovirusurilor.

Genomul ARN conţine 6 gene în ordinea 3'- N-P-M-G (X*)-L- 5' (fig. 398).

*X = genă NS la virusul infecţios pentru peşti, ce produce necroza hematopoetică; codifică o glicoproteină NS a virusului febrei bovinelor; o pseudogenă la virusul rabic.

Rhabdovirusurile au o variabilitate genetică extremă: în ADNc al genei L (6380 nt) de la diferite tulpini de rhabdovirusuri s-au identificat 16 mutaţii punctiforme. Frecvenţa mare a substituţiilor este atribuită infidelităţii ARN-polimerazei virale, dar se pot datora erorilor produse prin reverstranscriere. Mutantele termosensibile (*ts*) şi revertanţii apar cu frecvenţă mare, ceea ce reflectă erorile ARN-polimerazei. Tulpinile de virus rabic izolate din diferite zone geografice sunt distribuite în 4 variante antigenice.

Spectrul de gazdă este foarte larg. Multe rhabdovirusuri infectează insectele şi probabil şi alte artropode, dar nu se ştie în ce măsură transmit infecţia la vertebrate. VSV (virusul stomatitei veziculare) infectează insectele şi vertebratele.

Gradul de diferențiere a celulelor şi calea de administrare au rol în determinarea sensibilității la infecție. De exemplu, limfocitele în repaus nu sunt infectate, dar devin sensibile după activarea cu substanțe mitogene sau sub acțiunea antigenului specific, iar şoarecele este insensibil după inocularea intraperitoneală, dar este foarte sensibil la un inocul mic, intracerebral.

Citotropismul rhabdovirusurilor depinde, atât de existența receptorului celular de suprafață, cât şi de condițiile mediului intracelular pentru multiplicare. Receptorul celular împrumutat de virusul rabic este receptorul pentru *nicotin-acetilcolină*[*], dar virusul infectează şi celule care nu au un astfel de receptor.

[*] În funcție de acțiunea farmacologică a diferiților agonişti şi antagonişti s-au distins 2 tipuri de receptori: nicotinici şi muscarinici. Receptorii pentru acetilcolină sunt de tip nicotinic. Din aceiaşi categorie fac parte şi receptorii joncțiunii neuromusculare.

După legarea de receptor, virusul este internalizat în *endosom*. Scăderea valorii pH în endosom, determină fuziunea acestuia cu peplosul viral şi astfel ribonucleoproteina virală este eliberată în citoplasmă. Fuziunea este consecința modificării conformaționale a spiculelor glicoproteice inclavate în peplos.

Ciclul de multiplicare este întru-totul asemănător cu acela al paramixovirusurilor (fig. 399). VSV se fixează pe membrana celulei prin spiculele G şi este internalizat prin mecanismul endocitozei mediată de receptori (EMR). După acidifierea endosomului, glicoproteina G mediază fuziunea peplosului cu membrana endosomului, dezvelirea şi eliberarea nucleocapsidei.

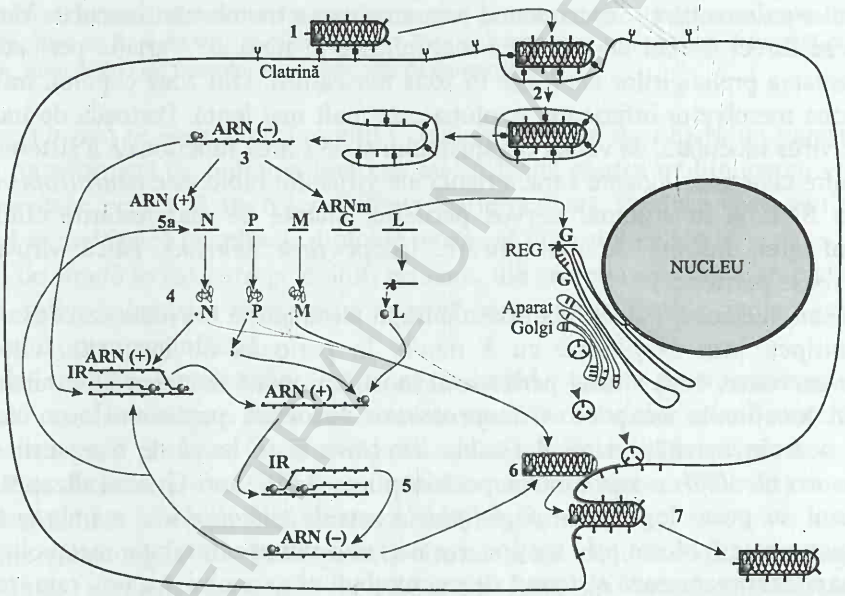


Fig. 399. Reprezentarea schematică a ciclului de multiplicare a rhabdovirusurilor. 1. Ataşare; 2. Fuziune; 3. Transcriere; 4. Traducere; 5. Replicarea genomului; IR – intermediari de replicare ; 5a. Transcriere secundară; 6. Asamblarea virionilor progeni; 7. Înmugurire.

Genomul VSV este transcris într-un ARN leader de 48 nt şi 5 ARNm monocistronici, traduşi în 5 proteine. Copiile de ARNm sunt mai numeroase pentru capătul 5' şi scad progresiv spre capătul 3', corelate cu raportul cantitativ al proteinelor virale, în ordinea N, P, M, G, L. Mai târziu, ARN genomic este transcris în ARN antigenomic de lungime completă, cu rol în replicare. Proteinele virale se sintetizează în citosol, pe polisomii liberi, cu excepția glicoproteinei de înveliş, care se sintetizează ca o proteină transmembranară, pe polisomii asociați reticulului endoplasmic granular. Moleculele sale sunt transferate pe calea cisternelor Golgi, la nivelul unor situsuri membranare speciale. Una dintre proteinele virale inhibă sinteza ARN şi ADN în celulele infectate.

Asamblarea. Nucleoproteina nascentă instabilă şi fosfoproteina se asociază cu ARN genomic şi îl stabilizează sau se agregă şi formează incluziile. Ulterior se asociază proteina L, formând complexul ribonucleoproteic (RNP). Proteina M se asociază cu RNP şi se produce condensarea

nucleocapsidei, ce formează o spirală strânsă. Alt rol al proteinei M este acela de a lega nucleocapsida de membrană, la locul înmuguririi. Nucleocapsidele migrează spre membrana celulară, la situsurile în care s-au inclavat spiculele glicoproteice. Proteina M interacţionează cu domeniul citoplasmatic al proteinei G şi iniţiază înmugurirea. La capătul aplatizat, membrana nu conţine proteina G.

Maturarea se poate face prin înmugurire în reticulul endoplasmic, în special în neuroni. Virusul rabic nu se multiplică în celulele enucleate, spre deosebire de VSV.

Majoritatea rhabdovirusurilor înmuguresc prin *membrana plasmatică*, dar unele se asamblează prin înmugurire la nivelul membranelor celulare interne. Cele care înmuguresc din membranele reticulului endoplasmic (citorhabdovirusuri), sau din membrana nucleară (nucleorhabdovirusuri) se acumulează în spaţiul perinuclear

*Gazde sensibile.*Virusul *rabic* infectează mamiferele. Cele mai sensibile sunt vulpea, şacalul, lupul, liliacul. Câinele şi pisica au o sensibilitate moderată. Virusul este transmis prin muşcătura animalului infectat.

După inocularea virusului prin muşcătură sau prin injecţie experimentală, urmează *faza de eclipsă*. Durata de incubaţie este variabilă: de la o săptămână până la un an, cu o perioadă medie de 31–90 de zile şi se explică prin necesitatea multiplicării în ţesutul muscular. La hamsterul inoculat experimental, prin metoda IF şi a ME, s-a evidenţiat că virusul se multiplică *intramuscular*. Din celulele musculare, virionii se eliberează prin înmugurire şi trec în spaţiile extracelulare, unde sunt expuşi acţiunii anticorpilor (sintetizaţi după infecţie sau administraţi sub forma serului imun – imunizare pasivă). Virusul rabic rămâne la sau lângă locul muşcăturii aproape toată perioada de incubaţie. Faptul s-a demonstrat experimental prin amputarea membrului inoculat. Virusul din inocul poate să invadeze direct ţesutul nervos, fără multiplicare în muşchi. Variaţia perioadei de incubaţie depinde de densitatea prelungirilor nervoase în zona muşcăturii. Din zona capului, infecţia evoluează rapid, iar din zona membrelor inferioare, evoluţia este mult mai lentă. Perioada de incubaţie depinde de cantitatea de virus inoculată, de vârsta organismului şi de starea funcţională a sistemului imunitar.

Una dintre cele mai evidente caracteristici ale virusului rabic este *neurotropismul*. Antigenele virale reapar în SNC şi în sistemul nervos periferic, înainte de manifestările clinice. După faza musculară a infecţiei, însoţită de multiplicare, începe *faza neurală*, adică virusul pătrunde în terminaţiile nervoase periferice.

Virusul sau nucleocapsidele infecţioase intră în terminaţiile nervoase senzitive şi motorii şi se răspândeşte centripet, prin *axoplasmă* cu 3 mm/h. In perioada de incubaţie, virusul se găseşte de-lungul căilor nervoase, de la situsul periferic al inoculării, până la creier. Diseminarea este uşurată de trecerea prin joncţiunile sinaptice. *Glicoproteina G* asociată peplosului este factorul major al patogenităţii şi neuroinvazivităţii virusului rabic. *Proteina G* se leagă de receptorii sinaptici de tip nicotinic pentru *acetilcolină* ai membranei postsinaptice. AMC anti-G neutralizează infecţiozitatea virionilor. Virusul se poate lega şi de *fosfolipidele* sau de *glicolipidele* membranare. Transportul virusului prin axon poate fi blocat prin secţionarea nervului sau prin inhibiţie metabolică cu colchicină aplicată local, care dezorganizează sistemul de microtubuli ai axonului. La om, rata transportului este evaluată la 50–100 mm/zi şi nu este influenţată de prezenţa Ac neutralizanţi. Deoarece virusul este transportat retrograd prin axoni, s-a folosit ca marker pentru identificarea căilor nervoase: proteina rabică P se asociază cu o componentă a dineinei din structura microtubulilor axonali.

Virusul ajunge în ganglioni şi în SNC şi se multiplică în neuroni, dar modalitatea diseminării interneuronale nu este cunoscută. Rareori virusul se multiplică în celulele gliale. După multiplicarea în sistemul limbic, animalul devine agresiv, ceea ce uşurează diseminarea. Substituţia la aminoacidul 333 al glicoproteinei G duce la pierderea virulenţei.

Tulpinile virulente exprimă o cantitate limitată de proteină G pe suprafaţa neuronilor, ceea ce limitează apoptoza numai la stadiul final al infecţiei, spre deosebire de tulpinile nevirulente, care exprimă o cantitate mai mare de proteină G şi induc apoptoza. Disfuncţia neuronală se poate datora alterării situsurilor de legare a mediatorilor sinaptici.

După multiplicarea în SNC, virusul îşi *modifică tropismul*: din nevrax trece centrifug prin prelungirile nervoase, inclusiv cele vegetative, până la ţesuturi şi organe: în glandele salivare (80% din cazuri), în epiteliul orofaringelui, dar virusul s-a izolat din muşchii striaţi şi cardiac, din rinichi, plămân. Nu se produce viremie: virusul evită contactul cu mediul extracelular. Infecţia glandelor

salivare este foarte importantă pentru diseminarea virusului prin muşcătură. În celulele acinare ale glandelor salivare, virusul se multiplică masiv şi se eliberează prin înmugurire în lumenul glandei sau în canaliculele intercelulare.

La câinele domestic, perioada de incubare este de 5 zile până la 14 luni, cu o medie de 3–12 săptămâni. Rabia canină are 2 forme clinice: *furioasă* (este infectat SNC: trunchiul, ganglionii nervilor cranieni, sistemul limbic etc.) şi *paralitică* (sunt infectaţi ganglionii nervilor spinali şi măduva). Virusul poate fi eliminat prin salivă cu 7 zile înainte de apariţia simptomelor şi animalul moare în 7 zile după declanşareea manifestărilor clinice. La mamifere, rabia nu este totdeauna fatală: câinele, pisica, liliacul şi mai ales şoarecele s-au recuperat după infecţia cu o doză mică de virus de stradă. În condiţii naturale, o doză mică de virus poate să imunizeze fără să producă rabia. 3% dintre animale se imunizează şi supravieţuiesc infecţiei naturale.

La om, perioada de incubaţie durează de la 4 zile până la mai multe luni. Clinic, infecţia are 3 faze majore: *prodromală**, *neurologică acută***, *comatoasă*.

* Faza *prodromală*, cu manifestări nespecifice, se declanşează după începerea multiplicării virale în SNC. Pacientul este iritabil, îşi pierde puterea de concentrare, cu dureri de cap, stare de rău general.

** Faza *neurologică* se caracterizează prin agitaţie (anxietate), alternanţa perioadelor de luciditate cu cele de delir, apoi deteriorare mentală, convulsii generalizate, comă, moarte. În forma furioasă a rabiei, virusul se multiplică în sistemul limbic şi în centrii nervoşi superiori, iar în forma paralitică este implicată măduva spinării şi ganglionii. Paralizia progresivă ascendentă, observată la animalele şi la omul rabic reflectă infecţia progresivă a ganglionilor rădăcinii dorsale.Tabloul patologic este influenţat de tulpina de virus sau de doza infectantă. Hidrofobia este rezultatul unei serii de reflexe spasmodice ale muşchilor inspiratori, declanşate de încercările de a bea apă, asociate cu o stare de teamă neexplicată. Obligat de sete să înfrunte teama, pacientul încearcă să bea, dar înainte de contactul cu apa, se declanşează o succesiune rapidă de respiraţii convulsive, ceea ce duce în final la stop cardiorespirator. Spasmul respirator hidrofob se datorează exagerării reflexelor protectoare (strănut, tuse, vomă) ale tractului respirator, faţă de corpurile străine.

In vitro, virusul se multiplică în culturi celulare primare de rinichi de hamster, câine, porc. Linia BHK-21 transformată de polioma este cea mai folosită pentru multiplicarea virusului rabic în scopuri experimentale, pentru că are o sensibilitate foarte marcată. Produce virus cu titru înalt cu ECP minime. Virusul se multiplică în celulele diploide umane (CDU) şi linia Vero.

Virusul de stradă se *izolează* pe culturi primare, din secreţia salivară a animalelor infectate. În 20% din cazuri, saliva animalelor rabice este negativă pentru virus. Practic, virusul rabic se găseşte în toate organele unui organism infectat.

ECP. În celulele vertebratelor, ECP apare rapid, cauzat de acumularea componentelor structurale virale cu efecte toxice. Blocarea sintezei macromoleculelor specifice celulei este rapidă. Celulele infectate secretă proteina G solubilă, mai scurtă cu 58 de aminoacizi. Anticorpii anti-G nu sunt protectori faţă de infecţia rabică. Infecţia rabică stimulează sinteza IFN. In concentraţie optimă, IFN poate împiedica îmbolnăvirea, dacă sinteza sa este timpurie.

Leziunile morfologice distincte pentru virusul rabic sunt *incluziile eozinofile* în neuronii ganglionari, pontini, corticali (în special în cornul lui Ammon), în celulele Purkinje din cerebel. Infecţia SNC este esenţială pentru diseminarea virusului.

Rabia. Infecţia rabică la om este sporadică, dar reprezintă o problemă majoră de sănătate publică, pentru că omul infectat prin muşcătura animalelor rabice sau după contactul cu saliva infectată, evoluează inexorabil spre moarte.

Virusul rabic se transmite şi pe alte căi: de la om la om, prin grefele de cornee; prin inhalarea virusului în peşterile populate cu lilieci; prin vaccinul inactivat incomplet; pe cale orală, dar este necesară o doză mare de virus

În ultimii 100 de ani, rabia este diagnosticată şi controlată pe următoarele căi:

– introducerea vaccinului rabic (Pasteur, 1885);
– descoperirea incluziilor Babeş-Negri, patognomonice pentru infecţie (1903)
– vaccinarea antirabică a câinilor (după 1940);
– administrarea serului hiperimun antirabic la om (după 1954);
– adaptarea virusului rabic în culturile de celulare (1958);

– testul anticorpilor fluorescenți pentru diagnosticul infecției pe secțiunile de creier ale animalelor infectate.

Aceste măsuri nu au fost aplicate în toate țările. Frecvența infecțiilor rabice în diferite țări se corelează invers cu complexitatea setului de măsuri.

Controlul rabiei la nivelul sursei este cel mai dificil. Virusul se menține în populațiile de animale sălbatice, prin perioada foarte lungă de incubație

Răspunsul imun. Virusul rabic este, în esență, *neuroinvaziv* și de aceea, foarte puțin accesibil reactivității imunitare. RIMH față de antigenele virale este neglijabil pe toată perioada de incubație, până la apariția simptomelor și rămâne scăzut tot timpul, sugerând că virusul evită contactul cu sistemul imunitar sau supresează răspunsul imun. La animalele infectate cu virus de stradă, IMC pare a fi supresată.

Anticorpii neutralizanți sunt induși numai de glicoproteinele învelișului și sunt protectori față de reinocularea animalelor de laborator. *In vitro*, Ac blochează atașarea virusului pe suprafața celulei. *In vivo*, titrul Ac nu se corelează cu gradul de protecție.

Vaccinul. Pasteur (1885) a utilizat vaccinul rabic inactivat, obținut prin desicarea țesutului nervos de la iepurele infectat. Vaccinul Semple (1911) este un preparat viral recoltat din creierul de iepure, oaie sau capră, inactivat cu formol și este protector față de virusul rabic, dar conține mielină și unele persoane vaccinate (1/2000) fac maladia neuroparalitică demielinizantă.

Creierul de embrion conține mai puțină mielină, astfel încât un vaccin mai sigur s-a preparat de la embrionii de rață infectați. Titrul Ac a fost mic după 10–14 doze zilnice subcutane, dar incidența neuroparaliziei a diminuat.

Vaccinurile vechi au fost înlocuite cu vaccinul obținut pe o tulpină *celulară umană diploidă,* inactivat cu β-propiolactonă. Este foarte imunogen după administrare pe cale subcutană sau intradermică. Sinteza Ac este accelerată după repetarea dozelor. Vaccinul se administrează profilactic: 3 doze la intervale de o săptămână, iar rapelul se face la fiecare 2 ani.

Anticorpii induși de glicoproteina G sunt neutralizanți, iar glicoproteina G inserată în membrana celulelor infectate este ținta limfocitelor Tc. Anticorpii neutralizanți se detectează la 7–14 zile după vaccinare.

Deși proteinele virale din vaccin sunt foarte imunogene, pacienții cu encefalită rabică sunt anergici.

Imunizarea profilactică se recomandă pentru cei ce călătoresc în ariile cu turbare canină endemică și a celor cu risc ocupațional de contact cu un animal rabid (grădini zoo, laboratoare).

Protecția post-vaccinală crește semnificativ prin imunizarea pasivă cu fracția Ig a serului antirabic (HRIG) obținut pe cal sau om, în primele săptămâni de la presupusa infecție.

Jumătate din doza HRIG este injectată la situsul mușcăturii rabice și reduce sau elimină încărcătura virală. Restul se administrează intramuscular, la alt situs. HRIG singur, chiar dacă nu este total protector, prelungește mult perioada de incubare. Faptul este foarte important pentru mușcăturile pe față sau cap, când incubația este scurtă (de 10–14 zile), înainte ca imunizarea să devină protectoare. HRIG pare să neutralizeze virusul inoculat la locul mușcăturii și să stimuleze răspunsul limfocitelor T. Serul este infiltrat profund sub/ și în jurul țesutului lezat.

Diagonsticul. Animalele rabide sunt eutanasiate imediat și creierul este testat pentru infecția rabică (WHO, 1997), prin evidențierea *incluziilor Babeș-Negri* pe secțiunile țesutului nervos din emisferele cerebrale și din cerebel. Țesutul se poate obține fără craniotomie, prin foramen magnum. Diagnosticul poate fi confirmat pe lamă, prin testul IFA (Ac imunofluorescenți anti-virus rabic), pe amprenta de creier fixată cu acetonă.

La microscopul optic, incluziile Negri sunt mase de material *eozinofilic* dens în citoplasma neuronilor, cu diametrul de 2–10 μm, în interiorul cărora se disting granule bazofile. La microscopul electronic (ME) se observă filamente dezorganizate într-o matrice amorfă ce constă dintr-o RNP rabică. Incluziile se găsesc la 75% dintre organismele infectate, cele mai numeroase fiind în hipocamp, celulele Purkinje, măduva spinării, ganglioni.

Virusul Borna infecțios pentru cal, are genom asemănător cu al rhabdovirusurilor. Spre deosebire de rhabdovirusuri, care se multiplică în citoplasmă, virusul Borna se multiplică în nucleul

celulelor infectate, ca şi rhabdoviridele plantelor. Virusul *Borna* este învelit, asemănător din punct de vedere structural cu rhabdo- şi cu paramixovirusurile şi a fost clasificat în familia *Bornaviridae*. Genomul ARN de polaritate negativă este unitar, dar este replicat şi transcris în nucleu. Dependența de nucleu rezidă în faptul că mesagerii virali sunt prelucrați prin clivare şi înnădire. Virusul manifestă neurotropism foarte puternic, determină infecții persistente şi nu lizează neuronii. Virusul Borna produce o maladie a SNC la cai şi oi în anumite zone ale Germaniei, ce se manifestă prin tulburări de comportament şi sfârşit letal. În SNC se infiltrează celule inflamatorii, care produc leziunile tisulare. Probabil, virusul Borna infectează mai multe specii de mamifere, inclusiv omul, unde poate fi implicat în patologia unor maladii cu tulburări de comportament.

21.4. Familia Filoviridae

Sunt *mononegavirale*, ca şi paramixo- şi rhabdovirusurile. Infecțiile la om sunt rare, dar manifestările de febră hemoragică cu rate înalte de mortalitate, sunt dramatice. Primul virus a fost izolat la Marburg (1967), ca rezultat a 3 episoade infecțioase simultane la personalul de laborator din Marburg, Frankfurt şi Belgrad, după importul maimuței verzi africane (*Cercopithecus aethiops*) din Uganda. Au fost infectate 31 de persoane (7 decese) care au avut contact direct cu animalele, cu țesuturile infectate sau cu sângele infectat. În Africa de est, virusul infectează maimuțele şi omul. In '76 şi '79 au apărut noi epidemii în Zair şi Sudan, produse de o tulpină înrudită dar distinctă: *virusul Ebola* (râu în Zair). Virusul se transmite prin contactul direct: pătrunde prin mucoase sau prin leziunile tegumentare.

Virionii sunt pleomorfi: filamente lineare, buclate sau ramificate, de unde s-a dat denumirea. Sunt printre cele mai mari virusuri cunoscute, cu o lungime variabilă de până la 14 000 nm (= 14 μm), datorită formării concatemerilor. Diametrul este de 80 nm. Nucleocapsida helicală, cu un ax central de 20–30 nm, este înconjurată de un peplos derivat din membrană, cu proiecții de 10 nm.

In vitro, virusul se multiplică rapid, cu efect litic, în citoplasma unui spectru larg de celule. Nucleocapsidele se învelesc printr-un proces de *extruzie a membranei celulare* şi nu prin înmugurire, ceea ce explică pleomorfismul.

ARN codifică 7 proteine: nucleoproteina, o glicoproteină, o polimerază (L) şi alte 4 proteine asociate nucleocapsidei.

Glicoproteina se sintetizează în 2 variante: una solubilă, mai mică, secretată de celula infectată şi alta alcătuită din 2 subunități, una fiind ancorată în membrană.

Virusurile *Marburg* şi *Ebola*, agenții febrei hemoragice africane, sunt foarte virulente pentru om şi maimuțe. Au tropism pentru celulele *sistemului fagocitar mononuclear, celulele dendritice, celulele endoteliale*. Virusurile se multiplică la titru înalt în ficat, plămâni, splină, rinichi.

Probabil că virusurile Marburg şi Ebola au o gazdă rezervor – un rozător sau un liliac şi se transmit accidental la om. Maimuțele nu constituie un rezervor de virus, pentru că infecția este letală şi nu pot perpetua virusul.

La om, virusurile Marburg şi Ebola se transmit prin *contact fizic direct* şi prin materialele infectate: ace, secreții, sânge, țesuturi. Virusul infecțios pătrunde prin mucoase sau prin leziuni tegumentare. Epidemia din '67 s-a datorat contactului direct cu țesuturile infectate sau cu echipamentul contaminat. Nu se transmite prin aerosoli. Epidemia se datorează introducerii virusurilor în comunitate de către o persoană infectată, urmată de diseminarea de la o persoană la alta.

Incubația este de 3–9 zile pentru virusul Marburg şi de 2–21 zile pentru Ebola. Febra hemoragică debutează brusc, cu febră, dureri de cap, artralgie şi o stare de rău extrem. Simptomele gastro-intestinale (gsi) apar în a 2-a sau a 3-a zi de stare, cu dureri abdominale, diaree, vomă. Sângerarea începe în ziua a 5-a de stare, din mucoasa tractului gsi, gingii, nazofaringe, vagin. Mortalitatea este înaltă cauzată de şocul hipovolemic prin sângerare abundentă. La gravide mortalitatea este de aproape 100%.

Bibliografie

Pastoret P. P., Brochier B. 1998. *Rhabdovirus*, Infection and Immunity, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed. ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.

Wagner R. R. *Rhabdoviridae* and Their Replication, în vol. Fundamental Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.
Wagner R. R., Rose J. K. 1996. *Rhabdoviridae:* The Viruses and Their Replication, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. Knipe M., Howley P. M. et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.
Baer G. M., Bellini W. J., Fishbein D. B. 1990. *Rhabdoviruses*, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.
Bode L., Ludwig H. 2003. Borna Disease Virus Infection, a Human Mental-Health Risk – Clin. Microbiol. Rev. 16: 534–545.
Smith J. S. 1996. New Aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis and prevention of the disease in the United States – Clin. Microbiol. Rev. 9, 166–176.
Carbone K. M. 2001. Borna Disease Virus and Human Disease as a Specific, albeit chronic Infection: Diagnosis and Treatment – Clin. Microbiol. Rev. 14, 727–752.
Zuckerman A. J., Banatvala J. E., Pattison J. R., Griffith P.D., Schoub B. D. 2004. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, John Wiley & Sons, Ltd.

21.5. Familia Picornaviridae

*Picorna** sunt printre cele mai mici virusuri cu genom ARN (pico = 10^{-12}g, unitate de măsură foarte mică). Virionii sunt sferici, nuzi (fără înveliş lipidic), cu diametrul de 24–30 nm. Este cea mai mare şi cea mai importantă familie de virusuri patogene pentru om şi pentru animalele de importanţă economică. Capsida este alcătuită din 60 de subunităţi identice, aşezate după modelul simetriei icozaedrice.

* Acronimul Picorna: ***p***olio ***i***nsensitivity to ether, ***c***oxsackie, ***o***rphan.

Primul reprezentant al familiei – *virusul aftei bovine* – a fost descris în 1898 (Loeffler şi Frosch). Familia cuprinde 5 genuri:

g. ***Enterovirus*** cuprinde:

– *poliovirusurile* umane (identificate în 1909, prin inocularea maimuţei cu virusuri izolate de la pacienţii cu poliomielită*) cu 3 serotipuri. Cele 3 serotipuri de poliovirus (1, 2, 3) au antigene specifice de tip, dar şi antigene comune. Infecţia primară produce Ac cu specificitate de tip. Infecţia secundară induce sinteza Ac care neutralizează şi celelalte 2 variante antigenice;

– *virusuri Coxsackie umane A* (oraş din statul New York, unde au fost izolate) produc miozita cu inflamaţia şi necroza fibrelor musculare. Sunt 23 serotipuri (A_1– A_{22}) şi A_{24};

– *virusuri Coxsackie umane B* – produc infecţii ale nevraxului, necroza muşchilor scheletici, pancreasului, miocardului), cu 6 serotipuri (B_1–B_6);

– *echovirusuri* umane (***e***ntero-***c***ytopathic ***h***uman ***o***rphan), cu 28 de serotipuri. Produc infecţii respiratorii (răceala comună, bronşiolită), dar sunt printre cei mai comuni agenţi ai meningitei şi s-au asociat cu diabetul de tip I;

– *enterovirusuri umane*, cu 4 serotipuri: 68–71;

– *enterovirusuri animale*, cu 34 de serotipuri.

Virusurile enterice invadează şi se multiplică în mucoasa tractului intestinal şi pot fi grupate astfel:

– virusuri care se multiplică predominant în mucoasa intestinului subţire şi produc gastroenterita acută (rotavirusuri, calicivirusuri, adenovirusuri, astrovirusuri);

– virusuri care se multiplică la orice nivel al tractului intestinal şi produc puţine simptome enterice, înainte de a produce manifestări clinice la distanţă: virusul rujeolei, enterovirusuri (polio, coxsackie, virusurile hepatitice A şi E);

– virusuri care se diseminează în tractul intestinal în stadiile tardive ale infecţiei sistemice, în special la gazdele imunocompromise infectate cu HIV sau CMV.

g. ***Hepatovirus*** – virusul hepatitei umane A (enterovirus 72).

g. ***Rhinovirus***, adaptate la epiteliul nazofaringian. Sunt acidolabile la pH mai mic de 6 şi produc răceala comună la copii şi adulţi. Sunt 102 serotipuri de rinovirusuri umane şi 2 serotipuri bovine.

g. ***Aphtovirus*** produce leziuni veziculare (afte) la paricopitate. Virusul aftos (FMDV) are 7 serotipuri (1–7), acido-labile la pH mai mic de 6.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

g. ***Cardiovirus***, rareori asociat cu maladii umane. Au fost izolate de la rozătoare, dar gazda naturală nu se cunoaşte. Are o singură variantă antigenică şi este acidostabil la pH 3. Genul cuprinde şi virusul *encefalomielitei murine Theiler.*

* Poliomielită : polios, lb. greacă = *cenuşiu*; myelos = *substanţă.*

Proprietăţi fizice. Virionii sunt sferici, cu diametrul de 24–30 nm, nuzi (fără înveliş lipidic) şi infecţiozitatea nu este modificată de solvenţi organici (eter), de deoxicolat sau de variaţi detergenţi care inactivează alte virusuri.

Preparatele virale liofilizate pierd 99,99% din titrul infecţios, ceea ce denotă că apa este esenţială pentru integritatea nucleocapsidei.

Simetria capsidei este icozaedrică, evidenţiată prin cristalografia cu raze x.

Stabilitatea la pH. Entero-, cardiovirusurile şi virusul hepatitei A sunt acidostabile, chiar la pH < de 3.

Rhino- şi aftovirusurile sunt labile la pH < de 6. Diferenţa de comportament reprezintă probabil o adaptare, deoarece enterovirusurile trebuie să traverseze stomacul pentru a ajunge la situsul de multiplicare – intestinul subţire. Rhino- şi aftovirusurile se multiplică în epiteliul mucoasei nazale şi orofaringiene.

Enterovirusurile sunt termolabile. Se inactivează rapid la 50°. Sunt stabile la temperaturi scăzute. Îşi păstrează infecţiozitatea la îngheţ pentru mulţi ani, rămân infecţioase timp de săptămâni la +4° şi câteva zile la t° camerei.

Genomul este o moleculă de *ARN monocatenar*, de polaritate pozitivă (funcţionează ca ARNm), cu o lungime desfăşurată de 2500 nm. La capătul 5'* este legată covalent *proteina genomică* (VPg = proteina genomică virală), cu rol de *primer* pentru sinteza ARN, dar şi în procesul împachetării ARN în virion, urmată de o secvenţă netradusă (ntr) de circa 750 nt. Capătul 3' conţine o secvenţă *ntr* mai scurtă şi se termină cu o secvenţă poli-A de lungime variabilă (fig. 400).

* Cele mai multe molecule de ARNm ale eucariotelor necesită un capăt 5' liber al ARNm, bonetat cu o guanozină metilată, importantă pentru legarea ribosomilor, iar iniţierea internă a traducerii nu este posibilă.

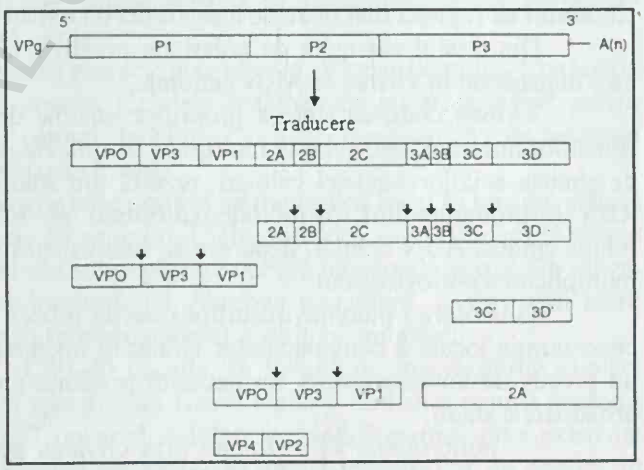


Fig. 400. Sus, organizarea genomului *Picorna*. ARN viral este asociat cu o proteină bazică, VPg (proteina virală genomică) la capătul 5', iar la capătul 3' are o secvenţă de acid poliadenilic – A(n). La cele două capete, se găsesc secvenţele netraduse (ntr). Funcţional, genomul este divizat în 3 regiuni de codificare: P_1, P_2, P_3. Jos, ARN viral este tradus într-o proteină gigantă, clivată succesiv de proteaze. Cu excepţia clivajului autocatalitic care eliberează VP_0 VP_3 şi VP_1 şi al clivajelor alternative mediate de proteaza 2A, care generează 3C' şi 3D', toate celelalte clivaje sunt mediate de proteaza 3C, ale căror situsuri sunt indicate de săgeţi (după Patick şi Potts, 1998).

Secvenţa 5'ntr a picornavirusurilor conţine un situs intern de intrare a ribosomilor (IRES = internal ribosome entry site), care permite legarea ribosomilor în absenţa bonetei terminale 5'. Regiunea genomică codificatoare a poliproteinei, este flancată la fiecare capăt de secvenţele *ntr.* Secvenţa codificatoare este împărţită în 4 regiuni (*L* codifică sinteza *proteinei Leader,* P_1–P_3), ce corespund produselor de clivaj primar al proteinei. Regiunea codificatoare a ARN este organizată într-un singur cadru de citire (ORF), fiind tradusă ca un mesaj unitar (monocistronic) într-o *poliproteină* de circa 2200 aminoacizi. Poliproteina include 2 secvenţe ce au rol de enzime proteolitice (proteaze intramoleculare) şi clivează proteina la poziţii specifice chiar în timpul traducerii (înainte de terminarea sintezei), astfel că o poliproteină de lungime reală nu se detectează în celulele infectate.

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

Clivajul primar al poliproteinei, sub acțiunea proteazelor generează polipeptidele P_1, P_2, P_3. Ulterior ele sunt clivate de 3 proteaze în 4, 3 şi respectiv 4 produse finale şi generează 11 molecule (chiar 12, pentru virusurile care codifică proteina leader). Cele mai multe clivări ale poliproteinei le catalizează *proteaza 3C*, sau precursorul ei, 3CD.

Proteina 3B este chiar VPg, 3D este ARN-polimeraza, iar 2C – o ATP-ază. Proteinele 2A, 3C sunt NS.

Secvențe genomice: ntr-750 nt L P1(precursor capsidă) P2 P3(replicaze) ntr
Proteine: 5'Vpg O----------L vP4 vP2 vP3 vP1 2A 2B 2C 3A 3B 3C 3D ---------- 3'AAAA.

Polimeraza 3D catalizează poli-uridilarea VPg, folosind secvența poli-A ca matriță. VPg-poliU are rol de primer pentru sinteza ARN de sens negativ.

Cultivare. Enterovirusurile se multiplică în CDU (celule diploide umane) şi produc ECP caracteristic. In mediu agarizat se formează plaje de liză. Determinarea numărului de plaje de liză este o metodă de titrare.

Ciclul de multiplicare

Enterovirusurile au un tropism tisular accentuat. Receptorii pentru poliovirus sunt *glicoproteine* cu *acid sialic*, deoarece sunt inactivați de NA. Sunt sensibili la tripsină şi se regenerează în 1–2 ore. Moleculele receptoare de virus au rol în legarea *factorilor de creştere*, iar altele sunt *integrine*, având rol în aderența intercelulară.

Virionii sunt încorporați în celulă prin *viropexie* (endocitoza mediată de receptori). Pe la vârfurile icozaedrului, capsomerele pentagonale pierd una din cele patru proteine (VP_4) şi ARN este eliberat în celulă. ARN genomic este tradus în poliproteina clivată ulterior în P_1, P_2, P_3.

Replicarea ARN se realizează prin intermediul *formei dublu catenare* şi a *intermediarului de replicare*. Catena genomică de *polaritate pozitivă* are rol de matriță pentru sinteza catenei de *polaritate negativă* (antigenomică). In molecula dublu catenară, catena de polaritate negativă are rol de matriță pentru sinteza ARNm şi a ARN genomic. Aparatul enzimatic este acelaşi pentru sinteza ambelor categorii de ARN. Din totalul ARN viral sintetizat în celula infectată, proporția moleculelor ARN de polaritate pozitivă este de 20–50 de ori mai mare decât a celor de polaritate negativă. Astfel, ribosomii au o şansă mai mare de a se asocia cu o matriță pozitivă decât cu una de polaritate negativă.

Din totalul catenelor de polaritate pozitivă, circa jumătate funcționează ca ARNm, iar restul este împachetat în virioni ca ARN genomic.

Virusul codifică sinteza propriilor enzime de replicare genomică. Nu necesită participarea funcțiilor nucleare, deoarece se multiplică în *celulele enucleate*. Independența replicării ARN genomic de sinteza acizilor nucleici celulari, rezultă din studiile cu inhibitori metabolici. *Inhibitorii sintezei ADN* (5-bromouracilul, 5-fluorodeoxiuridina) nu inhibă multiplicarea virusului. Actinomicina D inhibă sinteza ADN celular, deoarece se intercalează între bazele ADN dublu catenar, dar nu inhibă multiplicarea poliovirusului.

Asamblarea picornavirusurilor este un proces spontan (autoasamblare) şi este determinată de concentrația locală a componentelor virale, în imediata vecinătate a membranei citoplasmatice. Fiind un proces de autoasamblare, nu necesită prezența unor factori catalizatori. Asamblarea decurge în următoarele stadii:

- poliproteina P_1, rezultată prin clivarea polipeptidului gigant, se asociază în ansambluri pentamerice. 5 molecule P_1 formează un *pentamer*;
- 12 ansambluri pentamerice formează o *precapsidă* şi la exteriorul ei se asociază ARN genomic;
- în etapa a III-a are loc clivarea proteinei P_1 în VP_0, VP_1, şi VP_3;
- în etapa a IV-a se produce clivarea finală şi rezultă VP_1, VP_2, VP_3 şi VP_4, concomitent cu internalizarea genomului.

După clivarea proteinei P_1 rezultă capsida alcătuită din 60 de capsomere de formă triunghiulară (fig. 401), grupate în pentameri. Fiecare capsomeră este alcătuită din cele 4 proteine: VP_1 (1A), VP_2 (1B), VP_3 (1C), VP_4 (1D). Proteinele 1, 2, 3 ocupă vârfurile triunghiului, iar cea de a IV-a este situată într-un *plan inferior*, probabil în contact cu ARN genomic.

CUIMF / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

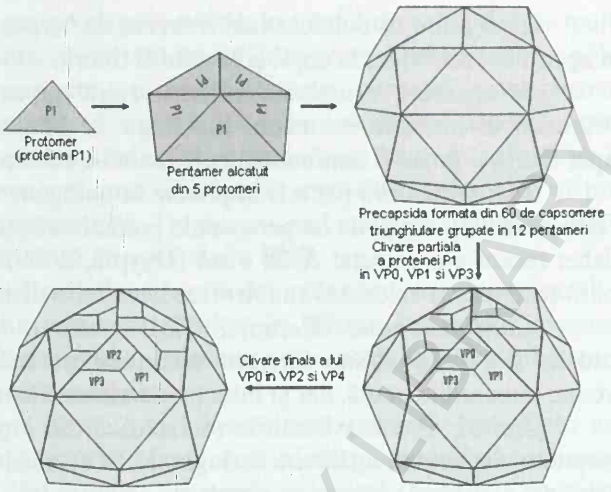


Fig. 401. Asamblarea capsidei picornavirusurilor. 5 molecule ale proteinei P1 se asociază şi formează un pentamer. 12 pentameri (fiecare cu câte 5 proteine P1) se asamblează într-o precapsidă. Proteina P1 se clivează parţial în VPo, VP1 şi VP3, iar ulterior, VPo este clivată în VP2 şi VP4. VP4 este aşezată în plan posterior.

Împachetarea genomului rămâne o problemă esenţială a morfogenezei picornavirusurilor. Genomul ARN se înfăşoară în jurul precapsidei şi induce modificarea conformaţiei proteinelor. Unele capside rămân goale.

Timpul necesar pentru desfăşurarea ciclului de multiplicare, de la infecţie până la asamblarea virionilor este de 5–10 ore. Randamentul infecţiei este de 25–100.000 virioni/celulă.

Studiul multiplicării picornavirusurilor a stat la baza a trei descoperiri importante:

– s-a demonstrat existenţa unei *ARN-polimeraze dependentă de ARN;*

– s-a identificat *forma de replicare dublu catenară* a ARN viral;

– s-a identificat sinteza unei *poliproteine* mari, care este supusă clivajului prin proteoliză din care rezultă proteinele funcţionale, ceea ce reprezintă o diferenţă majoră a procesului de traducere virală faţă de traducerea celulară.

Spectrul de gazdă variază mult de la un serotip la altul. Poliovirusurile au un spectru restrâns: în condiţii de laborator, cu un inocul masiv, infectează şi produc paralizia la maimuţă, după inoculare intracerebrală sau intraspinală. Infecţia orală este asimptomatică şi maimuţele devin purtătoare intestinale. In condiţii naturale, omul este singura gazdă.

Virusurile Coxsackie sunt infecţioase pentru şoarecii nou-născuţi. Virusurile polio, Coxsackie şi echo- recunosc acelaşi receptor al celulelor umane. Celulele rozătoarelor nu au receptor pentru virusurile polio şi nu pot fi infectate de virusul natural. In hibrizii celulari om-şoarece este necesară gena umană pentru exprimarea receptorilor care leagă virusul.

La om, poliovirusul pătrunde în organism pe cale orală şi se multiplică local în tonsile, plăcile Peyer, celulele epiteliale ale *nazofaringelui* şi ale *intestinului*. Ciclul infecţios se desfăşoară în aceste celule şi asigură perpetuarea sa în natură. Uneori virusul depăşeşte bariera intestinală şi trece în sânge. Faza *viremică* este urmată de infecţia ganglionilor limfatici. Viremia secundară, la titru mai mare poate fi urmată de infecţia organelor ţintă: măduva spinării, encefal, meninge, miocard.

Perioada de incubaţie variază între 2 şi 30–40 de zile, în funcţie de manifestările clinice. Forma paralitică a infecţiei este consecinţa unei specificităţi foarte înalte a virusului pentru neuronii din coloanele anterioare ale măduvei spinării. Tropismul celular se explică parţial prin existenţa moleculelor receptoare specifice, implicate în legarea virusului. Existenţa receptorilor nu explică în totalitate tropismul, deoarece sunt numeroase situaţii de infecţie abortivă, în care infecţia este iniţiată (virionul este internalizat şi genomul este dezvelit), dar este stopată într-o etapă ulterioară, ceea ce sugerează existenţa unor factori celulari, cu rol specific pentru sinteza macromoleculelor esenţiale ale ciclului de multiplicare virală (ARN, proteine).

Paralizia apare la un număr mic din totalul infecţiilor. Semnul predominant este paralizia flască acută, datorită leziunii neuronilor motori. Decesul se poate datora paraliziei muşchilor respiratori. Epidemia de poliomielită apare în lunile de vară, în zonele temperate. Uneori, la mai mulţi ani după recuperarea din atacul de poliomielită, unii pacienţi fac o insuficienţă motorie – sindromul post-poliomielitic, probabil datorat infecţiei persistente a neuronilor, cu virusul polio.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Encefalita este indusă mai frecvent de herpes simplex, dar şi enterovirusurile sunt recunoscute ca agenţi ai encefalitei la copii şi la adulţii tineri.

Miocardita, o maladie inflamatorie a miocardului, este produsă de virusurile Coxsackie B. Diagnosticul necesită examenul histologic al biopsiei endocardului. Miocardita neonatală poate fi rapid fatală şi poate fi confundată cu o maladie cardiacă congenitală.

Echovirusurile par a fi implicate în patogeneza cardiomiopatiei dilatative şi a diabetului de tip I, deoarece s-au izolat de la persoanele prediabetice şi diabetice de tip I, iar în sângele unor pacienţi cu diabet recent s-a detectat ARN viral (Hyypia, 2008). Echovirusurile şi alte enterovirusuri par a avea rol în patogeneza sclerozei amiotrofice laterale, o disfuncţie neurologică cronică progresivă.

Cardiomiopatia dilatativă (CMD) este o maladie postinflamatorie, cauză a insuficienţei cardiace şi a morţii subite. Singurul tratament este transplantul cardiac. S-a dovedit că enterovirusurile produc miocardita acută, dar şi infecţia persistentă asociată cu miocardita cronică şi cu CMD.

Izolare. Picornavirusurile se izolează din organele infectate. Enterovirusurile se izolează din conţinutul intestinal, spălătura faringiană, LCR, măduva spinării, creier, miocard (numai la copiii cu infecţie fulminantă), sânge, conjunctiva oculară, leziuni ale pielii. Metoda clasică a izolării utilizează culturi de celule de rinichi de maimuţă, urmată de identificarea ulterioară prin *serotipizare*.

ECP. La 30 de min. după infecţie se produce "efectul de întrerupere", adică inhibiţia rapidă a sintezei proteinelor celulare prin următoarele mecanisme:

– *inhibiţia transcrierii ARNm celulari* sub acţiunea unui factor codificat de virus care *inactivează ARN polimeraza II* celulară;

– *inhibiţia rapidă a traducerii ARNm celulari* preexistenţi sub acţiunea unui alt factor viral care inhibă un *factor celular de iniţiere a traducerii* (care se leagă la m^7G);

– *disocierea ribosomilor* de mesagerii celulari.

Cromatina îşi pierde textura microscopică omogenă şi se condensează în blocuri heterocromatice, asociate feţei interne a membranei (fenomenul de marginaţie). Se modifică componenţa histonelor. Modificările apar în decurs de o oră.

Diagnosticul serologic. Trăsătura dominantă a picornavirusurilor este numărul mare de serotipuri* – peste 217 şi cifra este în creştere.

**Numărul mare de serotipuri* de enterovirusuri, şi în special al rhinovirusurilor, se explică prin aceea că ARN-polimeraza schimbă frecvent matriţa. Fiecare *serotip* corespunde unei variante antigenice şi este definit de capacitatea unui *ser monospecific* de a-i neutraliza infecţiozitatea.

Serul monospecific se obţine prin imunizarea unui organism, neexpus anterior la contactul cu un virus înrudit. De exemplu, un izolat de virus polio este identificat ca tip 1, dacă infecţiozitatea lui este diminuată cu un factor stabilit convenţional (de ex., 100), în prezenţa unui ser de referinţă obţinut faţă de virusul de colecţie, definit ca tip 1.

Un alt serotip de polio este definit de incapacitatea aceluiaşi ser de referinţă de a neutraliza o altă variantă antigenică de virus, izolat din aceiaşi sursă şi care produce manifestări clinice identice.

Chiar în cadrul aceluiaşi serotip pot să apară mici diferenţe antigenice între diferitele izolate, dar Ac specifici faţă de o variantă a unui serotip sunt protectori faţă de oricare variantă a aceluiaşi serotip.

Identificarea serologică a celor 66 de serotipuri de enterovirusuri umane este greoaie. De aceea serurile hiperimune specifice, obţinute pe cal, au fost amestecate şi s-au obţinut diferite *combinaţii de antiseruri*.

Izolatele de enterovirusuri se incubează cu fiecare amestec de seruri şi se inoculează în substratul celular sensibil. După o incubare de câteva zile, se înregistrează aspectul neutralizării. Apoi varianta antigenică suspectată ca fiind un enterovirus se confirmă prin neutralizarea cu antiserul cu specificitate de tip antigenic.

Metoda diagnosticului serologic al infecţiei cu enterovirusuri este complicată de numărul mare de serotipuri şi de absenţa unui Ag de grup care să dea reacţie încrucişată cu toate antiserurile cu specificitate de tip. Metoda este dezavantajoasă: necesită timp, este costisitoare, disponibilitatea antiserurilor este limitată, apar unele virusuri netipabile (pot să conţină amestecuri de enterovirusuri).

Multe laboratoare utilizează metoda imunofluorescenţei directe (IFD), cu AMC marcaţi fluorescent, cu reactivitate de grup, iar tipul se identifică cu AMC cu specificitate de tip. Metodele moleculare (hibridarea ADNc, RT-PCR) au revoluţionat diagnosticul infecţiilor cu enterovirusuri, în special a celor care infectează SNC sunt rapide (rezultatele se obţin în câteva ore) şi economice.

Epidemiologie. Picornavirusurile se transmit prin intermediul aerosolilor infectaţi şi pe cale digestivă, prin ciclul fecal-oral, în condiţii igienice precare. Aftovirusurile sunt printre cele mai contagioase virusuri cunoscute. Situsul primar al multiplicării este ţesutul epitelial respirator şi gastro-

intestinal. Două sau mai multe enterovirusuri se pot propaga simultan în tractul digestiv, dar de multe ori apare fenomenul de *interferență*. Astfel, o infecție cu un enterovirus poate bloca vaccinul polio atenuat să se multiplice în intestin şi pentru a conferi imunitate este necesară revaccinarea. Multiplicarea primară poate fi urmată de viremie şi enterovirusurile infectează organele țintă secundare. Transmiterea respiratorie pare a fi importantă în zonele cu standarde bune de igienă, iar în condiții de igienă precară, enterovirusurile se transmit prin alimentele vegetale contaminate şi prin apă. Infecția situsului primar este adeseori asimptomatică. De aceea, mai mult de jumătate dintre echovirusuri s-au izolat din focare de infecție secundară, în special din SNC.

Patologie. Poliomielita este cea mai gravă maladie cauzată de enterovirusuri. Poliovirusul se multiplică în tonsile, în ganglionii limfatici din regiunea gâtului, în plăcile Peyer din mucoasa intestinului subțire. SNC poate fi invadat pe cale sanguină. Implicarea nervoasă se poate produce la copiii care, în momentul tonsilectomiei aveau infecție inaparentă.

Poliovirusul poate infecta anumite tipuri de neuroni şi rezultatul poate fi liza. Cele mai sensibile celule sunt motoneuronii medulari, dar în cazurile severe sunt infectați neuronii din coloanele posterioare şi din ganglionii rădăcinii dorsale. In nevrax, substanța reticulată, nucleii vestibulari, vermisul cerebelos, nucleii profunzi ai cerebelului sunt cei mai afectați. Cortexul este cruțat, cu excepția cortexului motor din girul precentral. Modificările apar rapid: de la cromatoliză medie, până la neuronofagie şi liză. Celulele afectate, dar nelezate, îşi pierd temporar funcțiile datorită edemului, dar se pot recupera complet. In majoritatea cazurilor, infecția cu poliovirus este *inaparentă*.

Patogeneza cu enterovirusuri non-polio este asemănătoare în stadiile inițiale ale infecției, dar organul țintă este variabil. Unele infectează SNC şi produc meningite sau paralizii, altele infectează mușchiul cardiac la copii (grupul coxsackie B) şi chiar pancreasul.

Singurul vaccin al unui enterovirus este obținut din virusul polio, multiplicat în celulele de rinichi de maimuță. *Vaccinul polio* cu virus inactivat (Salk), a fost introdus în 1955, iar după 1960 s-a folosit pe scară largă *vaccinul atenuat* (Sabin) al celor 3 tulpini. In perioada '55–'67 s-a realizat o reducere cu 99% a cazurilor de poliomielită în populațiile vaccinate.

Vaccinul inactivat are câteva avantaje:

– induce un nivel adecvat al Ac serici şi conferă imunitate humorală;

– elimină riscul mutației de reversie la virusul virulent;

– se poate administra persoanelor imunodeficiente şi celor supuse terapiei imunosupresoare;

– nu introduce în comunitate virusul infecțios care se poate răspândi necontrolat în populație;

– se poate administra copiilor în asociație cu vaccinul trivalent DTP (diftero-tetano-pertussis).

Dezavantaje:

– vaccinul polio inactivat induce un nivel scăzut al imunității locale (intestinale), astfel că tulpinile sălbatice de poliovirus se pot multiplica în intestinul persoanelor vaccinate. Anticorpii serici conferă protecție față de infecția paralitică, dar virusul excretat este sursă de infecție pentru indivizii nevaccinați;

– vaccinul inactivat este mai costisitor decât cel infecțios. Linia Vero în pasaj continuu a rezolvat problema substratului celular, înlocuind creşterea maimuțelor pentru rinichi.

Vaccinul polio infecțios are câteva avantaje:

– induce o imunitate de durată;

– administrarea orală este mai uşoară;

– tulpina atenuată induce sinteza rapidă a Ac, dar infectează tractul alimentar şi interferă cu infecția virusului epidemic;

– este mai ieftin şi nu necesită repetarea dozei;

– virusul atenuat din vaccin este infecțios, se multiplică în intestinul celor vaccinați, este eliminat şi infectează persoanele nevacinate cărora le induce o stare de imunitate solidă.

Dezavantaje:

– virusul atenuat poate să sufere mutație de reversie la o formă suficient de neurovirulentă pentru a produce paralizie la cei vaccinați sau la contacții lor;

– virusul din vaccin se disemineză la persoanele din comunitate. Acest fapt poate fi avantajos, dar dacă virusul progen este o mutantă neurovirulentă, dezavantajul este enorm. S-au semnalat cazuri de poliomielită asociate în timp şi spațiu cu administrarea vaccinului atenuat. Nu se ştie cert dacă aceste cazuri sunt determinate de virusul din vaccin sau de virusul sălbatic;

– vaccinul cu virus atenuat trebuie menținut la t° constantă sub 10°, pentru că altfel virusul este instabil. Se poate păstra la îngheț, dar după dezgheţare trebuie păstrat cel mult 30 de zile la t° frigiderului.

Infecțiozitatea enterovirusurilor poate fi păstrată chiar la 50°, dacă se stabilizează cu $MgCl_2$ 1M. Vaccinul stabilizat poate fi menținut peste un an la 4°.

În primele luni de viață se administrează vaccin inactivat şi ulterior vaccin atenuat. Combinația este foarte utilă pentru zonele cu risc mare de infecție.

Poliomielita nu este eradicată, pentru că vaccinul atenuat conține un virus mutant care, în timp poate creşte neurovirulența.

Se încearcă obținerea unui vaccin fără acid nucleic viral, care să conțină numai polipeptidele selectate stimulatoare ale răspunsului imun protector.

Virusul hepatitei A

Termenul de *hepatita A* şi *B* a fost introdus în 1947 (Mac Callum), pentru a diferenția hepatita infecțioasă (epidemică) de cea serică (icter seric).

Proprietățile fizice şi biochimice ale VHA sunt asemănătoare cu ale enterovirusurilor şi inițial a fost considerat ca enterovirus tip 72. Este un virus nud, care morfologic nu se distinge de alte picornavirusuri. Capsida este alcătuită din capsomere, fiecare fiind formată din 3 sau 4 proteine. Este rezistent la t° şi la agenții chimici care inactivează multe picornavirusuri. Genomul HAV are polaritate pozitivă şi este tradus monocistronic într-o poliproteină. Totuşi, VHA se deosebeşte de enterovirusuri prin secvența nucleotidelor genomice şi a aminoacizilor proteinelor capsidale şi a fost clasificat în g. *Hepatovirus*.

VHA se adaptează greu în cultura de celule şi se multiplică încet, fără ECP. Se crede că hepatotropismul este mediat de IgA asociat cu particula virală. Complexul IgA-virus se fixează pe hepatocit printr-o asialoglicoproteină cu rol de receptor.

Se cunosc 4 genotipuri şi un singur serotip, deoarece VHA are un grad înalt de conservare antigenică. Situsul antigenic dominant, foarte probabil, conformațional, inductor al RIMH este comun pentru toate variantele genotipice, iar anticorpii au efect neutralizant.

Genomul VHA (de 7478 nucleotide) cuprinde 3 regiuni:

– o regiune 5' necodificatoare, care cuprinde circa 10% din genom (733 baze);

– un cadru de citire, ce codifică proteinele virale P_1 (proteine capsidale), P_2 şi P_3 (proteine nestructurale);

– o scurtă secvență necodificatoare 3' (64 baze);

VHA este stabil la pH 3 (ca toate enterovirusurile) şi rezistent la eter, cloroform, freon (dichloro-difluoro-metan), deoarece din compoziția chimică lipsesc lipidele.

VHA este mai rezistent la căldură decât alte picornavirusuri: este stabil la 60° timp de 60 de min., spre deosebire de alte picornavirusuri care-şi pierd infecțiozitatea la 56° în 30 de min. VHA se dezintegrează la 61°.

$MgCl_2$ 1M stabilizează virusurile şi dezintegrarea se produce la 81° pentru VHA şi la 61° pentru polio.

Infecția naturală urmează ingestiei alimentelor contaminate cu VHA de origine fecală. Secvența evenimentelor de la intrarea pe cale digestivă până la declanşarea hepatitei nu este cunoscută.

La copiii mai mici de 6 ani, majoritatea infecțiilor (70%) sunt subclinice, iar cele clinice, sunt anicterice.

Perioada de incubație este de 15–50 zile, după care apar simptomele nespecifice urmate de cele gastro-intestinale. Perioada icterică durează mai puțin de 2 luni, dar 15–20% dintre pacienți pot avea manifestări clinice extinse pe circa 6 luni. Hepatita fulminantă este rară şi se produce la copiii de vârstă şcolară şi la adulții vârstnici cu maladie hepatică cronică de fond.

Sediul principal al multiplicării este *hepatocitul*, cu viremie, este secretat în secreția biliară şi este eliminat în scaun. Fecalele pot să conțină 10^9 virioni/gram şi sunt sursa principală a infecției cu VHA. VHA s-a detectat în saliva umană, ceea ce denotă că timpuriu, multiplicarea are loc în orofaringe şi în glandele salivare, ca şi pentru polio. În infecția experimentală la maimuță, Ag VHA s-a găsit în splină şi rinichi.

BCUJ - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Titrul viral maxim în materialul fecal este atins înainte de faza icterică şi scade după icter.

Cultivare. VHA se izolează şi se propagă cu dificultate în câteva tipuri de culturi celulare umane şi neumane: culturi de AGMK, fibroblaste umane, CDU, culturi celulare de rinichi. *In vitro*, VHA necesită o perioadă de adaptare pentru cultivare, iar după adaptare produce infecţii persistente şi se atenuează (nu mai determină infecţia după inoculare la maimuţe). Cantitatea de virus este mică, iar ECP este minim.

Epidemiologie. Infecţia cu VHA se propagă în condiţii de igienă precară. Persoanele supuse riscului infecţiei: călători în ariile endemice*, consumatorii de moluşte preparate insuficient, consumatorii de droguri.

* Evoluţia endemică este definită prin apariţia cazurilor relativ rare de infecţie care se menţin numeric constante într-o colectivitate şi apar cu o relativă regularitate, de obicei sezonier, la intervale variabile de timp. Majoritatea indivizilor populaţiei sunt rezistenţi la infecţia cu agentul infecţios.

ECP constă în creşterea volumului celular, liza membranei, picnoză nucleară. Cauzele lizei hepatocitelor nu se cunosc: liza hepatocitelor poate fi consecinţa multiplicării virusului sau a răspunsului imun anti-virus. Cu cât pacientul este mai tânăr, cu atât infecţia este mai uşoară. Majoritatea pacienţilor se recuperează complet, progresia la ciroză fiind foarte rară.

Patologie. Probabil că majoritatea infecţiilor cu VHA sunt subclinice. Infecţia simptomatică este acută, de obicei autolimitată, rareori (0,1–0,2%) având o evoluţie fulminantă, fatală. Perioada de incubaţie este de 2–6 săptămâni, cu o medie de 4 săptămâni. În 10% din cazuri se produce icter. Faza icterică durează 2–22 de zile. Principalii parametri biochimici ai infecţiei constau în creşterea ALT (alanin-aminotransferaza) şi mai puţin a AST (aspartat-aminotransferaza), al căror nivel seric se corelează direct cu gradul leziunilor hepatice. Liza celulelor hepatice este cea mai amplă în zonele periportale, asociate cu infiltratul mononuclear.

Recuperarea este însoţită de protecţie imună solidă pentru tot restul vieţii, mediată de Ac circulanţi şi poate fi transferată pasiv.

Diagnosticul se confirmă prin evidenţierea virusului în scaun sau prin creşterea titrului de anticorpi specifici. Testul serologic este mai fidel, deoarece până ce pacientul se adresează medicului, organismul se poate steriliza. Serul recoltat în câteva săptămâni de la declanşarea simptomelor conţine Ac specifici antivirali, aproape exclusiv IgM.

Vaccin. Se foloseşte un *vaccin inactivat* cu formol, obţinut dintr-un omogenat de ficat de marmotă infectată sau preparat viral obţinut în culturi celulare, inactivat cu formol sau β-propiolactonă.

Tulpinile virale *atenuate* prin pasaje succesive la primate, nu produc hepatită. Au fost multiplicate în fibroblaste diploide umane.

Imunizarea pasivă cu HNIG (Human nonspesific IgG). Administrarea înainte de expunere a redus incidenţa infecţiei cu 90%.

Virusul hepatitei E

VHE a fost descoperit în 1980 ca agent etiologic al unei epidemii de hepatită, în India, transmisă prin apa de băut. Pacienţii au rămas negativi pentru Ac anti-HAV. VHE are un genom ARN mc, de polaritate pozitivă, poliadenilat la capătul 3'. Se deosebeşte de VHA prin aceea că secvenţa codificatoare este transcrisă în 3 cadre de citire, flancate de secvenţe scurte *netraduse* 5' şi 3'.

Are însă numeroase asemănări cu VHA:

- ambele virusuri hepatitice (A şi E) produc *infecţii autolimitate*, asociate cu inflamaţia ţesutului hepatic;
- ambele se transmit prin *ciclul fecal-oral*, ceea ce le distinge de celelalte virusuri hepatitice;
- se multiplică în *hepatocite* şi sunt excretate prin secreţia biliară în intestin, iar în final se elimină la un titru înalt în materialul fecal al indivizilor infectaţi (10^6–10^8 virioni infecţioşi/g de conţinut intestinal;
- sunt *virusuri nude*, ceea ce le conferă rezistenţă şi stabilitate în secreţia biliară;
- sunt eliminate direct în mediul extern, ceea ce favorizează *epidemiile explozive*, care nu există la celelalte virusuri;

- se multiplică lent şi ineficient *in vitro*. Titrul maxim este atins în câteva săptămâni. Pasajele repetate măresc randamentul de multiplicare şi intervalul de timp se scurtează;
- nu produc infecţii persistente, nu sunt asociate cu hepatita cronică şi nici cu CHC.

În 1990 genomul s-a secvenţiat, iar ulterior s-au identificat tulpini infecţioase pentru porc şi respectiv pentru puiul de găină. Dovezile epidemiologice sugerează că hepatita E este o zoonoză, porcul şi alte specii fiind rezervoare naturale de virus.

Iniţial VHE a fost clasificat, provizoriu, în familia *Caliciviridae*. Ulterior a fost denumit *Hepevirus* şi atribuit familiei *Hepeviridae*, neacceptată de ICTV (Meng, 2008).

Rhinovirusuri

Denumirea (Rhino) reflectă locul primar al infecţiei cu aceste virusuri – epiteliul cavităţilor nazale. Primul rhinovirus a fost izolat în 1957, iar în 1960 s-au izolat virusurile care produc ECP pe culturi de rinichi de embrion uman. S-au identificat peste 100 de serotipuri, numerotate prin antiserul specific, într-un program de colaborare sprijinit de OMS. Procesul mutaţional şi cel de selecţie sub presiunea factorilor imunitari selectează tipuri antigenice noi de rhinovirusuri.

Structura s-a evidenţiat prin metoda cristalografiei cu raze x, la nivelul rezoluţiei atomice. Capsida este alcătuită din 60 de subunităţi identice, distribuite în 12 pentameri într-un icozaedru. Fiecare subunitate constă din 4 proteine structurale: VP1-VP4. VP1-3 sunt localizate la suprafaţă şi interacţionează cu Ac specfici. VP4 este localizată la interiorul capsidei, asociată strâns cu ARN genomic. 5 subunităţi VP1 delimitează o depresiune ce formează un canion, inaccesibile regiunii Fab a Ig. De aceea s-a presupus că acesta este ligandul pentru receptorul celular.

Genomul, ARN monocatenar, are 7200 nucleotide: o secvenţă 5' necodificatoare de 620 nucleotide şi o secvenţă 3' necodificatoare de 50 nucleotide, ce preced secvenţa poli-A.

Receptorii pentru rhinovirusuri. Rhinovirusurile pătrund în organism la nivelul mucoasei nazale, prin intermediul aerosolilor şi al mâinilor infectate, la nivelul conjunctivei sau al mucoasei orale şi se multiplică în special în celulele epiteliale ale tractului respirator superior, dar şi în epiteliul traheo-bronşic. Rhinovirusurile grupului *major* se ataşează de *molecula de aderenţă intercelulară* (ICAM-1). ICAM-1 (o glicoproteină de 95 kDa din suprafamilia Ig), în condiţii fiziologice are rol de receptor pentru Ag1 al limfocitelor (LFA1 = lymphocyte function associated Ag-1). Astfel, ICAM uşurează interacţiunea limfocitelor cu CPA şi migrarea lor la situsul inflamator. Situsurile de legare ale LFA-1 şi ale rhinovirusurilor grupului major pe molecula ICAM sunt distincte, dar se suprapun semnificativ. În funcţie de receptorul celular, rhinovirusurile aparţin grupului major (90%) şi grupului minor (10%). Rhinovirusurile grupului *minor* se leagă de receptorul pentru LDL (low density lipoproteins), incluzând şi receptorul pentru VLDL.

Infecţia este iniţiată de doze mici de virus, dacă inoculul ajunge în nazofaringe. Evoluţia infecţiei depinde atât de doza de virus, cât şi de titrul Ac serici. Perioada de incubaţie este de 1–4 zile. Eliminarea virusului este maximă la 2–4 zile de la infecţie. Nu există fază viremică. Rhinovirusurile infectează numai omul. Nu s-au izolat de la animale.

Infecţia induce sinteza unui număr mare de citokine proinflamatorii (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-13, IL-16, TNF α, IFNγ) şi antiinflamatorii (IL-1Ra, IL-10), dar produce ECP minim al celulelor mucoasei nazale: edemul şi infiltrarea uşoară a neutrofilelor sunt modificările histologice cele mai evidente, asociate cu secreţia cataralâ. Secreţia nazală are un conţinut ridicat de proteine (albumina, IgG şi proteinele glandelor mucoase – lactoferina, lizozim, sIgA), datorită creşterii permeabilităţii vasculare mediată de aminele şi secreţiei glandulare stimulată de reflexele colinergice.

Situsul primar al multiplicării rhinovirusurilor este epiteliul nazal, dar infecţia poate progresa la nivelul traheii. Infecţia nu produce un ECP detectabil al epiteliului, dar induce edemul mucoasei cu uşoară infiltrare a celulelor inflamatorii, mai ales neutrofile. Frecvenţa mişcărilor ciliare diminuează şi odată cu ele, rata de clearance mucociliar. In secreţia nazală creşte concentraţia proteinelor plasmatice: albumină, IgG şi a proteinelor secretate de glandele epiteliului (lactoferină, lizozim), datorită creşterii permeabilităţii vasculare. Modificările reflectă creşterea permeabilităţii vasculare.

Infecţia celulelor epiteliale şi infiltrarea neutrofilelor este asociată cu eliberarea unui spectru larg de IL proinflamatorii: IL-1β, -2, -4, -6, -8, -11, -12, -13 etc. Edemul mucoasei şi infiltrarea celulelor inflamatorii pot induce complicaţii: otita, sinuzita. Infecţia cu rhinovirusuri potenţează răspunsul alergic.

Virusurile se izolează din secreţiile orale, ale orofaringelui şi chiar din materiile fecale. Injectarea la voluntari, a unor doze mari de rhinovirusuri, direct în intestinul subţire, nu a produs infecţie. Aceasta sugerează că diferenţa majoră dintre rhinovirusuri şi enterovirusuri, cu privire la capacitatea de a induce infecţii intestinale, nu rezidă în sensibilitatea rhinovirusurilor la mediul acid al stomacului.

Patologie. Majoritatea infecţiilor sunt asimptomatice. Afecţiunea tipică a infecţiei cu rhinovirusuri implică tractul respirator superior şi este *răceala comună*, cea mai frecventă cauză a morbidităţii virale la om. Situsul major al simptomelor răcelii este mucoasa nazală: strănutul, obstrucţia nazală, secreţia nazală abundentă (rinoree), dureri în gât, de cap, tuse, frisoane şi, rareori, febră. Expunerea la frig nu creşte sensibilitatea la infecţie. Statutul nutriţional al organismului şi densitatea populaţiei sunt factori majori ai riscului de infecţie. Perioada de incubaţie este de 1–2 zile, simptomele ating intensitatea maximă la 2–3 zile şi durează 5–7 zile. Rareori, se extind pe durata a 2-4 săptămâni. Severitatea simptomelor este strict individuală şi se corelează cu starea fiziologică generală a organismului, cu memoria imună indusă de infecţiile anterioare cu rhinovirusuri, dar în special cu reactivitatea imunitară generală. Infecţiile cu rhinovirusuri exacerbează astmul.

Rinovirusurile produc 50% din totalul cazurilor de răceală comună. *Coronavirusurile* produc 20%, iar restul de 30% sunt cauzate de adenovirusuri, parainfluenza, RSV, influenza.

Epidemiologie. O caracteristică a rhinovirusurilor este specificitatea înaltă de gazdă. Ele se izolează cu cea mai mare frecvenţă de la persoanele care au suferit răceala comună. Cele peste 100 de serotipuri de rhinovirusuri s-au numerotat prin numărul antiserului specific neutralizant, într-un program sprijinit de OMS. Noile tipuri de rhinovirusuri emerg printr-un proces de mutaţie şi selecţie imunitară.

Serotipurile predominante se schimbă sezonier. Intre ele nu există reactivitate încrucişată: anticorpii specifici faţă de un serotip nu neutralizează celelalte serotipuri. Infecţia cu oricare din cele peste 100 de serotipuri poate produce răceala. Din această cauză, vaccinarea este ineficientă.

În climatul temperat sunt două perioade ale incidenţei maxime a a infecţiei cu rhinovirusuri: toamna şi primăvara. În sezonul rece, incidenţa infecţiei este scăzută. Sunt infectate persoanele din toate grupele de vârstă. Serotipurile prevalente variază de la un an la altul.

Imunitate. Infecţia cu un rhinovirus activează răspunsul imun humoral şi celular. IgG şi IgA serici încep să crească la o săptămână după inocularea voluntarilor şi ating valoarea maximă la o lună. Titrul IgG rămâne crescut un an, iar IgA scade lent. Creşterea lentă a titrului denotă că Ac nu sunt esenţiali pentru recuperare. Titrul mare al Ac este protector faţă de re-infecţia cu acelaşi serotip. Virusul este inactivat prin agregare, activarea C, blocarea legării de receptori. Factorul primar al rezistenţei la infecţia cu rhinovirusuri este sIgA, produsă de limfocitele B din submucoasă.

Eradicarea procesului infecţios este rezultatul activării IMC (Papadopoulos şi col., 2004). Spre deosebire de specificitatea înaltă a Ac, celulele T recunosc atât epitopii specifici, cât şi pe cei înrudiţi. In timpul infecţiei, numărul limfocitelor circulante scade, dar curând revine la normal şi poate să crească semnificativ (leucocitoză). Rhinovirusurile infectează, dar nu se multiplică în macrofagele căilor respiratorii.

Diagnosticul infecţiei cu rhinovirusuri se pune prin izolarea virusului pe un substrat celular, prin teste serologice sau prin detectarea acizilor nucleici. Rhinovirusurile se izolează din spălătura nazală sau din aspiratul nazal. Se multiplică în culturile de ţesuturi embrionare umane (H) sau de maimuţă (M). Nu se multiplică în organismul animal.

Cele mai bune substraturi sunt fibroblastele pulmonare umane şi tulpinile HeLa. Condiţiile optime pentru multiplicarea rhinovirusurilor includ o concentraţie de 0,35 g/l de bicarbonat, pH 7,0–7,2), t° = 33° şi o uşoară rotaţie a recipientului cu cultura celulară infectată, la 12 r/min. Culturile se examinează pentru ECP, detectabil la 24 ore, ce constă în contracţia, rotunjirea şi detaşarea celulelor de suport. Majoritatea probelor evidenţiază ECP la 8 zile. Pentru confirmarea identităţii se evaluează stabilitatea la pH acid şi neutralizarea cu antiser cu specificitate cunoscută. Metodele serologice se folosesc pentru detectarea Ac antivirali, dar răspunsul humoral este tardiv şi face ca aceste metode să nu fie utilizabile. În plus, datorită numărului mare de serotipuri (peste 100), testul neutralizării nu se utilizează în diagnosticul de rutină.

Reacția HAI se aplică pentru unele rhinovirusuri care aglutinează hematiile. ELISA este cea mai rapidă şi mai sensibilă şi are avantajul că diferențiază izotipurile de Ig din probă (ser, secreție nazală). Dar, ca şi în cazul altor teste serologice, metoda este utilă pentru diagnostic numai când serotipul virusului este deja cunoscut.

Profilaxie şi *terapie*. Nu există un preparat vaccinal datorită numărului mare de serotipuri față de care Ac sunt specifici şi nu reacționează încrucişat.

Dintre agenții farmacologici antivirali, IFNα este cel mai folosit. Se administrează local (intranazal), înainte sau puțin după expunerea la virus. Nu s-a identificat nici un compus de sinteză care să inhibe infecția prin interferență cu dezvelirea sau cu alte etape ale multiplicării. Medicația antihistaminică are efecte favorabile uşoare.

Bibliografie

Blaine Hollinger F., Ticehurst J. 1990. Hepatitis A Virus, în vol. Virology, Second Edition, 1990, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Howard C. R., Zuckerman A. J. 1990. Viral Hepatitis, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Robertson B., Lemon S. 1998. Hepatitis A and E Viruses, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Rueckert R. R. 1990. *Picornaviridae* and Their Replication, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Rueckert R. R. 1996. *Picornaviridae:* The Viruses and Their Replication, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.

Rueckert R. R.. 1990. Enteroviruses*:* Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Couch R. B. 2001. Rhinoviruses, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York, 1990.

Rueckert R. R.. 2001. *Hepatitis A: Old and New* – Clin. Microbiol. Rev. 14, 38–58.

Nainan O. V., Xia G., Vaughan G., Margolis H.S. 2006. Diagnosis of Hepatitis A Virus Infection: a Molecular Approach . Clin. Microbiol. Rev. 19: 63–79.

Patick A. K., Potts K. E. 1998. Protease Inhibitors as Antiviral Agents. Clin. Microbiol. Rev. 11: 614–627.

Belsham G. J., Sonenberg N. 1996. RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation. Microbiol. Rev. 60(3): 499–511.

Norkin L. 1995. Virus Receptors: Implications for Pathogenesis and Design of Antiviral Agents. Clin. Micr. Reviews 8, 2: 293–315.

Papadopoulos N. G., Johnston S. L. 2004. Rhinoviruses, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Carter J. B., Saunders V. A. 2007. Virology: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Ltd.

Meng X. J. 2008. Hepatitis E Virus, în vol. Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology, editors Mahy Brian W. J., Regenmortel Marc H. V. Academic Press.

Hyypia T. 2008. Echoviruses, în vol. Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology, editors Mahy Brian W. J., Regenmortel Marc H. V. Academic Press.

21.6. Arbovirusuri. Familia Flaviviridae

Denumirea semnifică faptul că virusurile sunt menținute în natură, în primul rând sau într-o măsură importantă prin transmitere biologică între gazdele vertebrate sensibile, prin intermediul artropodelor (*ar-bo* = *ar*thropod *bo*rne). Prin definiție, arbovirusurile au cel puțin 2 gazde: *un vertebrat* la care produc viremie, ceea ce permite ca virusul să fie preluat de un *artropod hematofag*. Termenul *arbovirus* nu are semnificație taxonomică, deoarece include un grup heterogen de virusuri din 7 familii: *Toga-* (1 din 2 genuri), *Flavi-* (1 din 3 genuri), *Rhabdo-* (2 din 6 genuri), *Bunya-* (3 din 5 genuri), *Reo-* (2 din 12 genuri), *Orthomyxoviridae* (1 din 5 genuri), *Poxviridae* (virusul mixoma transmis de țânțar produce leziuni tegumentare la anumite genuri de *Leporidae*; virusul fibromului Shope, transmis de un artropod, produce papilomul Shope la iepurele de vizuină *Sylvilagus* în America de Nord). Catalogul internațional descrie 535 arbovirusuri, toate având genom ARN, cu excepția virusului febrei suine africane şi a virusurilor *Pox* care au genom ADN.

S-au identificat numeroase artropode vectoare ale virusurilor infecțioase pentru animale şi plante. Arbovirusurile se multiplică în organismul artropodelor într-un interval de 1–2 săptămâni fără

să producă leziuni, se disemineză şi infectează glandele salivare. Când artropodul se hrăneşte hematofag, virusurile sunt inoculate la gazda vertebrată, unde se multiplică şi produc viremie. Ciclul poate fi criptic, pentru că vertebratul face o infecţie inaparentă, dar în ciclul artropod-vertebrat, virusul este transmis accidental, la animale sensibile şi la om. In evoluţie, presiunea selectivă indusă de interacţiunea cu virusurile, diseminarea a fost favorizată de gazdele care fac viremie fără manifestări clinice. Pe de altă parte, mamiferele mici şi păsările sensibile pot face infecţii mortale, dar se înmulţesc suficient de repede pentru a genera indivizi sensibili şi astfel sunt populaţiile ideale pentru propagarea virusului. Animalele domestice sensibile sau care fac infecţie inaparentă fac legătura între ciclul natural şi cel uman. Omul se poate infecta prin contactul cu ţesuturile animale infectate, prin lapte sau prin vectorii infectaţi de la gazda vertebrată.

Numeroase virusuri infecţioase pentru vertebrate sunt transmise de artropode vectoare, fără să se multiplice în vector. Unele se transmit pe verticală, *transovarian,* în organismul ţânţarului *Phlebotomus* şi al căpuşii *Ixodes*.

Aproape toate infecţiile produse de arbovirusuri sunt *zoonoze*. Ciclul natural al transmiterii artropod-vertebrat rămâne nedectabil până când omul interferă cu ciclul natural.

Virusurile pot fi transmise la vertebrate care în mod obişnuit nu fac parte din ciclul natural. Unele arbovirusuri sunt transmise în ciclul om-artropod-om, produc viremie semnificativă la om şi determină epidemii. Majoritatea arbovirusurilor se găsesc în ţările tropicale (Africa şi America de sud).

Infecţiile cu arbovirusuri, la om, produc infecţii *febrile*, cu dureri de cap, mialgie, frisoane şi uneori cu stare generală foarte alterată. Pot produce *hemoragii* severe sau encefalită, cu sfârşit letal sau cu sechele neurologice permanente.

Infecţia are un parcurs bifazic: *febră uşoară-medie*, adeseori neobservată în stadiul viremic iniţial; *perioada de stare a encefalitei*, cu viremie ce poate fi mascată de RI. Numai o mică proporţie dintre cei infectaţi fac encefalita. Majoritatea fac numai faza iniţială a infecţiei, ce poate fi asimptomatică.

Infecţiile cu arbovirusuri, la om produc 3 tipuri de manifestări clinice:

- de cele mai multe ori, infecţiile sunt *febrile* nespecifice (pantomorfe);
- *infecţii neuromorfe* (encefalite) (virusul West Nile din regiunile temperate). Virusurile meningo-encefalitice au în comun proprietatea de *neuroinvazivitate*;
- *infecţii visceromorfe* (febre hemoragice). Unele arbovirusuri pot fi asociate cu mai multe entităţi clinice, în funcţie starea imunitară a gazdei şi de localizarea tisulară a infecţiei. Astfel, un arbovirus poate să producă o febră minoră la unii pacienţi, encefalită sau febră hemoragică la alţii.

Infecţiile cu arbovirusuri au distribuţie geografică localizată şi vectori distincţi. Fiecare continent tinde să aibă propriile arbovirusuri: virusul encefalitei equine venezuelene (vee), virusul encefalitei de vest (wee), de est (eee), al encefalitei japoneze etc. Arbovirusurile sunt denumite după procesul patologic pe care-l produc (febra galbenă, denga) sau după aria geografică în care au fost izolate iniţial (encefalita St. Louis, febra West Nile).

Familia Flaviviridae (flavus = galben) cuprinde peste 70 de virusuri, împărţite în 3 grupe pe baza modului de transmitere: circa jumătate sunt transmise de ţânţari; 11 sunt transmise de căpuşe, iar restul nu au vector cunoscut. Produc infecţii clinice şi uneori letale la om şi animale: g. *Flavivirus*, g. *Pestivirus*, *virusul hepatitei C*.

În natură infecţia se propagă alternativ între vertebrate (mamifere, păsări) şi vectori (ţânţari, căpuşe). Omul este infectat accidental, când intră în ecosisteme noi, dar nu are semnificaţie pentru ciclul propagării.

Cele 3 virusuri au proprietăţi biologice distincte şi nu manifestă reactivitate serologică încrucişată, dar sunt asemănătoare morfologic, ca organizare genomică şi în privinţa mecanismului replicării ARN genomic. Sunt agenţi cauzali ai multor maladii infecţioase umane, în special *encefalite*.

Structură. Virionul are diametrul cuprins între 37–50 nm şi o simetrie icozaedrică. Genomul este o moleculă de ARN mc de polaritate pozitivă, de 11 kb lungime. Învelişul conţine 2 proteine: M (membrane) şi E (envelope).

Multiplicarea are loc în citoplasmă. Receptorii celulari pentru aceste virusuri nu se cunosc, dar s-a observat înglobarea specifică a virionilor cuplaţi cu Ac specifici, în macrofagele cultivate.

Randamentul multiplicării flavivrusurilor poate să crească de 20–1000 de ori, dacă virionii au fost puşi în contact cu anticorpii specifici la un titru subneutralizant. Macrofagele au receptori pentru Fc. Acesta este fenomenul de *enhancement imun*, dependent de existența receptorilor pentru Fc pe celulele sensibile şi nu este strict specific flavivirusurilor.

ARN genomic este tradus ca un mesaj unitar. Toate proteinele virale rezultă prin prelucrare co- şi post-traducere. ARN infecțios are rol de matriță pentru sinteza unei catene complementare negative. Ulterior catenele multiple anticomplementare au rol de matrițe pentru sinteza catenelor de lungimea genomului.

În celulele infectate s-a identificat numai ARNm de lungimea ARN genomic.

Virionul encefalitei japoneze (VEJ) conține 3 proteine structurale: C, M, E. In celula gazdă virusul codifică sinteza altor 7 proteine nestructurale: NS_1, NS_{2A}, NS_{2B}, NS_3, NS_{4A}, NS_{4B}, NS_5. Virionii se asamblează înmugurind prin membranele reg, în veziculele citoplasmatice. Virionii imaturi conțin proteina precursoare M (prM) şi sunt transportați prin sistemele membranare ale căii secretorii, la suprafața celulei, unde are loc exocitoza. Curând după eliberarea din celulă, prM este clivată de furină (o protează) şi rezultă virioni maturi care conțin proteina M. În timpul multiplicării virusului, sinteza macromoleculelor celulare continuă până în stadiul tardiv când ECP devine evident.

VEJ infectează numeroase specii de vertebrate. Este letal pentru puii nou născuți de şobolan, indiferent de calea de inoculare. Neuroinvazivitatea scade odată cu vârsta şi adulții sunt sensibili numai după inoculare intracerebrală. Şoarecele rămâne sensibil la infecția encefalitică la orice vârstă. La primate, după inoculare intracerebrală, virusul provoacă o infecție letală, iar inocularea periferică produce numai o infecție asimptomatică.

Calul şi omul fac encefalite. Virusul transmis prin înțepătura țânțarului se multiplică, probabil în limfocitele ganglionare şi are o fază viremică înainte de a invada SNC. Nu se cunoaşte mecanismul prin care virusul traversează bariera sânge-creier.

Patologie. Flavivirusurile pot produce infecții, de la cele asimptomatice sau febrile, cu erupție eritematoasă sau artralgie sau ambele, până la febre hemoragice, hepatite şi encefalite letale. Manifestările clinice reflectă tropismul virusurilor pentru diferite organe țintă. Cele mai reprezentative sunt febra galbenă, encefalita japoneză, encefalita St. Louis.

Febra galbenă este tipică pentru flavivirusurile transmise de țânțari (*Aedes aegypti*) şi căpuşe. Infecțiile transmise de țânțari sunt mai comune la tropice, iar cele transmise de căpuşe prevalează în regiunile temperate.

Febra galbenă este produsă de un *flavivirus viscerotrop* şi variază în ceea ce priveşte intensitatea manifestărilor clinice, de la infecția inaparentă, până la evoluția fulminantă în 3 zile. Perioada de incubație este de 3–6 zile. Faza inițială se caracterizează prin viremie şi virusul este preluat de țânțari. În cazurile severe, manifestările acute timpurii nespecifice (dureri de cap, musculare, friguri, stare de rău general) sunt urmate de o scurtă perioadă de remisie, urmată de atacul hemoragic hepatic cu icter şi infecția rinichiului. La pacienții alcoolici, mortalitatea este de 20–50%.

Prin pasaje repetate s-a obținut o mutantă cu virulență atenuată, utilizabilă ca *vaccin* protector față de infecția cu virusul febrei galbene. Sunt modificate proteinele de înveliş, ceea ce diminuează eficiența legării virusului de receptorii celulari, atenuează tropismul şi reduce virulența.

Virusul Denga este clasificat în familia *Flaviviridae*, deoarece este asemănător virusului febrei galbene. Genomul ARN monocatenar de polaritate pozitivă are un ORF de 10 233 nucleotide, ce codifică un polipeptid de 3 411 aminoacizi. Regiunea necodificatoare la capătul 5' are 18 nucleotide, urmată de primul codon AUG la care este inițiată traducerea. Secvența necodificatoare este mai scurtă decât secvența omologă a picorna-, la care traducerea nu începe la primul codon AUG.

În structura virionului se găsesc 3 proteine: C (core); M (proteina asociată peplosului); E (de înveliş). Virusul imatur conține proteina precursoare-M. Genele ce codifică proteinele structurale sunt localizate la capătul 5' şi cuprind mai mult de ¼ din totalul genelor. Ordinea genelor în molecula de ARN este C – preM (M) – E.

Proteina C este bazică, fiind bogată în lizină şi arginină şi interacţionează cu ARN. Nu are secvenţă hidrofobă, ceea ce sugerează că se sintetizează pe ribosomii liberi. Glicoproteina E este un homotrimer, localizat pe suprafaţa virionului matur.

Proteinele nestructurale (NS) s-au identificat şi cartat pe genomul ARN prin secvenţierea limitată a aminoacizilor C- şi N-terminali. Ordinea proteinelor NS, după gena proteinei E, este NS_1, NS_{2a}, NS_{2b} (ambele codificate de gena NS_2), NS_3, NS_{4a}, NS_{4b} (codificate de gena NS_4) şi NS_5. NS_3 ar fi o protează virală cu rol în prelucrarea poliproteinei, ar fi o componentă a ARN-polimerazei virale sau ar îndeplini ambele funcţii enzimatice. Proteinele NS_4 au funcţii necunoscute.

S-au descris 4 variante antigenice (serotipuri): DENV-1; -2; -3; -4.

Ciclul de multiplicare. Virusul pătrunde în celulă prin fuziune şi eliberează nucleocapsida în citoplasmă sau membrana plasmatică se intruzează şi formează o veziculă de endocitoză (endosom) în jurul virionului învelit. In condiţiile unui pH acid, peplosul viral fuzionează cu membrana endosomului şi eliberează nucleocapsida în citoplasmă.

Replicarea ARN. Din celulele infectate cu virusul Denga, în gradient de sucroză s-au izolat 3 forme de ARN:

- ARN 20–22 S, rezistent la RN-ază (forma de replicare, formată din cele 2 catene de polaritate opusă);
- ARN heterodispers 20–28 S, parţial rezistent la RN-ază (intermediarul de replicare, parţial dublu catenar);
- ARN 42 S, sensibil la RN-ază.

Forma de replicare poate fi convertită la ARN 42 S sub acţiunea factorilor denaturanţi (căldura), iar intermediarul de replicare este convertit la ARN 42 S şi variate fragmente mai mici.

Asamblarea parcurge următoarele faze:

- asamblarea nucleocapsidei din proteina C şi ARN;
- înmugurirea nucleocapsidei prin membranele ce conţin proteinele E şi M;
- eliberarea din celulă prin înmugurire sau prin vezicule de endocitoză;
- clivarea proteinei M, ceea ce duce la reorganizarea suprafeţei şi maturarea virionului.

Spre deosebire de alfavirusuri care se maturează prin înmugurire la nivelul membranei citoplasmatice, flavivirusurile se învelesc la nivelul cisternelor reg şi în cisternele Golgi. S-au identificat 4 serotipuri ale virusului, fiecare cu numeroase variante genomice.

Epidemiologie. Ţânţarii (*Aedes aegypti, A. albopictus*) sunt singurele gazde naturale ale virusului Denga. Infecţia este transmisă prin înţepătura insectei infectate. In condiţii naturale, virusul produce îmbolnăviri numai la om. Oricare dintre cele 4 serotipuri produce o stare viremică, cu durata medie de 4–5 zile. In faza viremică, virusul este ingerat de ţânţar şi infectează celulele intestinului mijlociu. După 8–12 zile, virusul infectează glandele salivare ale insectei, de unde, la o nouă hrănire, este transmis la om.

ECP. Virusul Denga se cultivă pe celulele mamaliene şi de insecte. Infecţia celulelor nu blochează biosinteza proteinelor celulare. ECP constă în creşterea refractilităţii, rotunjirea şi chiar fuziunea celulelor.

Patologie. Infecţia este caracterizată prin erupţie eritematoasă tegumentară, asociată cu creşterea volumului celulelor endoteliale ale vaselor mici, edem perivascular şi infiltrarea celulelor mononucleare, dar în celulele epidermei nu s-au identificat virioni şi nici antigene virale. Patogenitatea este amplificată de fenomenul de enhancement imun: Ac ne-neutralizanţi formează complexe cu virionii şi stimulează infecţia fagocitelor mononucleare prin intermediul receptorilor pentru regiunea Fcγ. După infecţie, acestea eliberează mediatorii vasoactivi ce produc creşterea permeabilităţii vasculare. Pierderea plasmei poate fi medie şi tranzitorie (DHF = Dengue hemoragic fever) sau severă şi prelungită, urmată de şocul hipovolemic şi moarte (DSS =Dengue shock syndrome). DSS este mai comună la infecţia secundară, dar apare şi după infecţia primară, ceea ce sugerează că Ac subneutralizanţi omologi, induşi de infecţia primară sau alţi factori imunitari pot produce fenomenul de enhancement imun.

Diagnosticul infecţiei se face prin izolarea virusului infecţios sau prin izolarea anticorpilor specifici.

Non-arbovirusurile grupate în g. *Flavivirus* se găsesc fie la artropode, fie la vertebrate, dar nu la ambele şi au importanţă medicală redusă; g. *Pestivirus*; *Arterivirus* (virusul arteritei equine) şi *LDH* (virusul lactic dehidrogenazei).

Pestivirus, virusul infecţios al mucoaselor, nu infectează omul, dar are importanţă medicală veterinară.

Virionii au diametrul de 60 nm, sunt sferici, înveliţi şi au o regiune centrală electrono-densă. Pe suprafaţa virionului proemină trei tipuri de glicoproteine, asociate prin punţi S-S ca homo- sau heterodimeri.

Virionii îşi pierd infecţiozitatea prin încălzire la 56° pentru 30 min., prin tratamentul cu solvenţi organici şi detergenţi. Îşi păstrează infecţiozitatea la un spectru larg de variaţie a pH.

Genul *Pestivirus* include 4 entităţi infecţioase:

- virusul febrei suine clasice (CSFV);
- virusurile diareei bovine 1 şi 2 (BVDV);
- virusul border (BDV), descoperit în 1959 în zona de graniţă a Angliei şi Ţării Galilor ca infecţie congenitală a oilor şi caprinelor.

Gazdele sensibile la infecţia cu *Pestivirus* sunt mamiferele artiodactile (rumegătoare cu copita despicată şi porcul). La bovine şi ovine, BVDV produce frecvent infecţii persistente, cu rol de rezervor pentru menţinerea virusului. Virusul este transmis de la animalele viremice asimptomatice, la cele neinfectate. Virusul pătrunde pe cale nazală sau orofaringiană, cel mai adesea, prin contact direct, favorizat de aglomerările de animale sau de practica marcării.

Infecţia persistentă se produce după ce virusul traversează placenta şi infectează fătul în perioada timpurie a dezvoltării. Infecţia intrauterină induce starea de toleranţă şi astfel animalele infectate persistent elimină continuu cantităţi mari de virus, dar sunt negative pentru anticorpii specifici. Ele pot face o boală fatală a mucoaselor, cu diaree sanguinolentă datorită ulcerării extensive a tractului gastro-intestinal.

CSFV produce *holera porcului*, o infecţie gravă, foarte contagioasă, care produce pierderi economice în toată lumea. In Europa infecţia a fost eradicată, dar virusul este reintrodus periodic, prin importul de carne. Transmiterea se face predominant pe orizontală, prin contact direct şi prin fecale, urină, secreţii nazale, dar virusul se poate transmite vertical, prin celulele germinale infectate persistent. Holera porcului este o infecţie acută cu mortalitate semnificativă. Cele mai frecvente infecţii sunt cele cronice cu manifestări clinice medii şi cele persistente consecutive infecţiei intrauterine. Transmiterea intrauterină poate duce la moartea fătului sau la infecţia clinică letală a nou-născuţilor.

Virusul se multiplică în celulele epiteliale ale tractului digestiv, în celulele endoteliale ale vaselor sanguine şi limfatice, în celulele limfoide, în macrofage.

Virusul rubella la om, BVDV şi BDV la rumegătoare pot produce infecţii *inaparente*. Infecţia în primele 3 luni de gestaţie, la bovine şi ovine, cu tulpini virale necitopatice (ncp), duce cel mai adesea la moartea fătului sau animalele nou născute sunt aparent normale, purtătoare de virus, dar negative pentru anticorpi. Infecţia timpurie, în timpul diversificării repertoriului receptorilor de Ag ai limfocitelor, induce starea de *toleranţă* şi animalele rămân infectate persistent toată viaţa. Animalele pozitive pentru virus, dar negative pentru Ac, reprezintă un rezervor important de virus infecţios. Suprainfecţia animalelor tolerante cu o tulpină mai virulentă, citopatică, produce o infecţie fulminantă şi animalele mor datorită unui sindrom al bolii mucoaselor, asociat cu distrugerea epiteliului intestinal, leziuni inflamatorii ale tractului alimentar şi depleţia ţesutului limfoid din plăcile Peyer.

Tulpinile ncp şi cp sunt foarte înrudite antigenic. Cele ncp rezultă prin evenimente mutaţionale din cele cp.

In vitro se multiplică puţin şi se purifică greu pentru că se eliberează ineficient din celulele infectate, fiind asociate cu resturile celulare.

Virusul hepatitei C (g. *Hepacivirus*)

Virionii înveliţi, cu aspect sferic şi simetrie icozaedrică, s-au izolat din plasma umană. Cantitatea de preparat obţinută din infecţiile *in vivo* sau *in vitro* este foarte mică, ceea ce îngreunează studiile structurale şi biochimice.

Virionii se găsesc sub 2 forme structurale:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

– *virioni compleți*, cu un înveliș lipidic derivat din membranele celulei în care sunt inclavate glpr E_1 și E_2, proeminente la suprafață (diam. 55 nm) (fig. 402). Existența învelișului este sugerată de sensibilitatea la cloroform: preparatul viral își pierde infecțiozitatea;
– nucleocapside nude, fără înveliș (33 nm. diam.).

Virionii se asociază cu *β-lipoproteinele* serice și cu Ac formând complexe neinfecțioase mai ușoare și respectiv, mai dense.

Genomul este o moleculă de ARN mc de *polaritate pozitivă*, asemănătoare pesti- și flavivirusurilor, de circa 9400 nt, căreia îi lipsește secvența poli-A-3', dar infecțiozitatea sa nu s-a demonstrat (fig. 403).

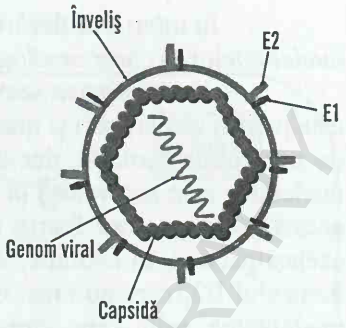


Fig. 402. Componentele structurale ale VHC.

Informația genetică este organizată *într-un singur cadru de citire* (ORF) și se sintetizează o *poliproteină* de circa 3000 de aminoacizi. Clivajul poliproteinei generează proteinele structurale și proteine NS. La capetele 5' și 3' sunt secvențe simetrice netraduse (ntr), iar ORF cuprinde peste 95% din secvența genomică.

Proteinele structurale C, E1 și E2 sunt codificate de pătrimea 5' a genomului, iar proteinele NS (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a și NS5b), de restul moleculei.

Genomul izolat a fost transcris în ADNc și folosind sisteme de expresie *in vitro* și *in vivo* s-au identificat proteinele codificate. Majoritatea sunt *nestructurale* (NS). Concluzia a rezultat din analiza comparativă a proteinelor din preparatul viral și din celulele infectate.

Codon inițiator

5'---------- AUG H_2N - C - E_1 – E_2/NS1 – NS2 - NS3 - NS4 – NS5 - COOH ----------UUUUU- 3'

ntr (341 nt) Core Env 4a 4b 5a 5b (polimerază) ntr (27-66 nt)

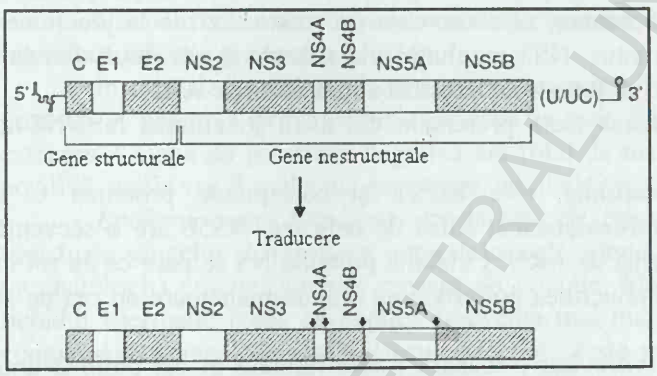


Fig. 403. Organizarea genomului HCV. Regiunea codificatoare este flancată de secvențele netraduse 5' și 3'. Genomul este tradus într-o poliproteină ce conține atât proteinele structurale (C, E_1 și E_2), cât și nestructurale (NS_2–NS_{5B}). Săgețile indică situsurile la care clivează proteaza NS_3 (după A. K. Patick and K. E. Potts, 1998).

Secvența de la capătul 5' codifică proteinele structurale (S) și este cea mai bine conservată la toate variantele genetice izolate de VHC. Secvența ntr 3' este scurtă, fiind urmată, la cele mai multe izolate, de poli UUU (pentru că *in vitro* se leagă cu oligo dT celuloză) și codifică proteinele nestructurale.

Primul produs al poliproteinei este proteina C (neglicozilată) a capsidei, care se complexează cu ARN și formează nucleocapsida. Următoarele două proteine (E1 și E2) sunt inclavate în peplos.

Variantele genomice. Analiza comparativă a secvențelor genomice de la diferite izolate din întreaga lume, arată că VHC este foarte *heterogen*.

S-au delimitat *6 genotipuri majore de VHC și peste 100 de variante genomice și antigenice*. Intre cele 6 genotipuri majore este o omologie a secvenței de 70–80%. La izolatele celor 6 genotipuri, secvența 5' ntr este cea mai bine conservată (omologia fiind de circa 90%), regiunea 3' este relativ bine conservată, având o omologie de 81–88%. Alte regiuni genomice au un grad superior de diversitate. Regiunea E1 și NS5 sunt cele mai variabile.

În interiorul fiecăruia dintre cele 6 genotipuri s-au identificat variante genetice – *subtipuri* notate *a, b, c*. În total sunt mai mult *de 12 subtipuri*. Secvența nucleotidelor diferitelor subtipuri are un grad de asemănare de 89–93%.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

In interiorul fiecărui subtip sunt alte *variante genetice*, cu o variație *mai limitată a secvenței nucleotidelor*, a căror omologie se situează între 94–99% pentru regiunea C, E1 și NS5.

Variabilitatea secvenței de nucleotide se datorază faptului că replicarea genomului HCV este predispusă la erori și mutațiile generează în organismul infectat, o populație de virioni cu secvențe de nucleotide înrudite, dar diferite, fenomen denumit 'efect de quasispecie*. Variația secvenței de nucleotide este accentuată în regiunea genomică ce codifică regiunea N-terminală a E2. Secvențele în această regiune sunt foarte variabile la izolatele individuale, dar și între izolatele succesive de la același pacient. In evoluție, variația nucleotidelor a fost generată de Ac neutralizanți specifici față de domeniul E2, care au creat o presiune selectivă permanentă. Variația antigenică a proteinei E2 este modalitatea prin care virusul evită efectul neutralizant al Ac. Ca dovadă, variația secvenței codificatoare a proteinei E2 este mult mai redusă la pacienții agamaglobulinemici.

* In general, *genomul ribovirusurilor* are dimensiuni reduse, iar rata de mutație/nucleotid/tur de replicare este maximă, fapt care permite o rată de evoluție genetică de milioane de ori mai rapidă decât a gazdelor lor. Supuse permanent presiunii selective a factorilor de apărare a gazdei, evoluția virusurilor este exclusiv *adaptativă*. Ratele foarte înalte de mutație, generează așa numitele "mutante de roire" sau populații de *quasispecii* de virusuri, care conferă o mare adaptabilitate multiplicării virale, menită să compenseze șansa minimă a interacțiunii cu substratul permisiv. Quasispeciile de virusuri ARN se adaptează la un prag de erori mutaționale, compatibil cu multiplicarea. Virusurile se multiplică la limita superioară a mutabilității și adaptabilității. Datorită ratei înalte a mutației, clonele de ribovirusuri și retravirusuri sunt quasispecii sau "mutante roitoare", care prezintă variații genetice genomice.

Mutabilitatea accentuată se datorează naturii intrinseci a funcției ARN-polimerazei virale, predispusă la erori ("error prone"), ca o consecință a absenței funcției de corectare ("proof reading"), în timp ce majoritatea ADN-polimerazelor virale își corectează erorile proprii.

Diversitatea genomică are câteva consecințe:

- severitatea infecției poate să depindă de genotip;
- diferitele genotipuri răspund diferit la tratamentul cu IFN;
- eficiența vaccinului este anulată de evoluția mutantelor care scapă acțiunii neutralizante a Ac.

Proteinele. Regiunea NS a genomului codifică proteinele NS2–NS5. Clivarea poliproteinei este catalizată de proteaze virale. Una dintre proteaze este secvența de aminoacizi de la joncțiunea NS2-NS3, cu funcție autocatalitică a acestui situs. NS3 rezultată prin autoclivaj are două domenii funcționale: unul cu funcție de protează și unul cu funcție de helicază a moleculei de ARN.

NS3 este o *serin-protează*, care clivează toate proteinele din aval: joncțiunea NS3/NS4a, NS4a/NS4b, NS4b/NS5a, NS5a/NS5b.

Proteina C, componentă a nucleocapsidei, este bazică și corespunde proteinei C a flavivirusurilor. NS3 are și activitate nucleotid-fosfatazică, adică de helicază. NS5b are o secvență terminală specifică ARN-polimerazei dependentă de ARN. Celelalte proteine NS se pare că au rol în multiplicarea și asamblarea virusului în RE. Prelucrarea poliproteinei este asemănătoare cu cea de la alte flavi- și pestivirusuri.

Multiplicarea. VHC se multiplică *in vitro* într-o măsură foarte limitată în cel puțin 2 linii celulare T umane, cu ECP minim, greu detectabil, iar cantitatea de virus eliberat din celule este mică. Evidențierea multiplicării este detectabilă prin metode sensibile (RT-PCR). În 2005, s-a izolat o tulpină virală (JFH-1 –Japanese fulminant hepatitis) care se multiplică cu un randament foarte bun într-o tulpină de hepatocarcinom uman (Huh-7) (Bartenschlager, 2008).

Pătrunderea virusului în celulă este mediată de molecule receptoare neidentificate.Virionii sunt înglobați prin endocitoză mediată de clatrină. Ulterior, peplosul fuzionează cu membrana endosomului acid și genomul este eliberat în citoplasmă. ARN de polaritate pozitivă este tradus pe reg, dependentă de secvența IRES (internal ribosomal entry site). Se sintetizează o poliproteină clivată de semnal-peptidazele celulei și de proteazele virale. După clivaj se formează un complex de replicare, asociat cu membranele, format din ARN viral, proteine virale și factori celulari. Catenele de polaritate negativă au rol de matriță pentru sinteza ARN de polaritate pozitivă cu funcție de mesager. După sinteza proteinelor, moleculele de ARN de polaritate pozitivă se asociază cu proteina C și formează nucleocapsidele virale. Proteinele E rămân inserate în membranele reg. Nucleocapsidele se învelesc prin înmugurire în lumenul reg. Particulele virale sunt transportate pe calea secretorie a cisternelor Golgi. Veziculele de transport fuzionează cu membrana citoplasmatică și virionii sunt eliberați.

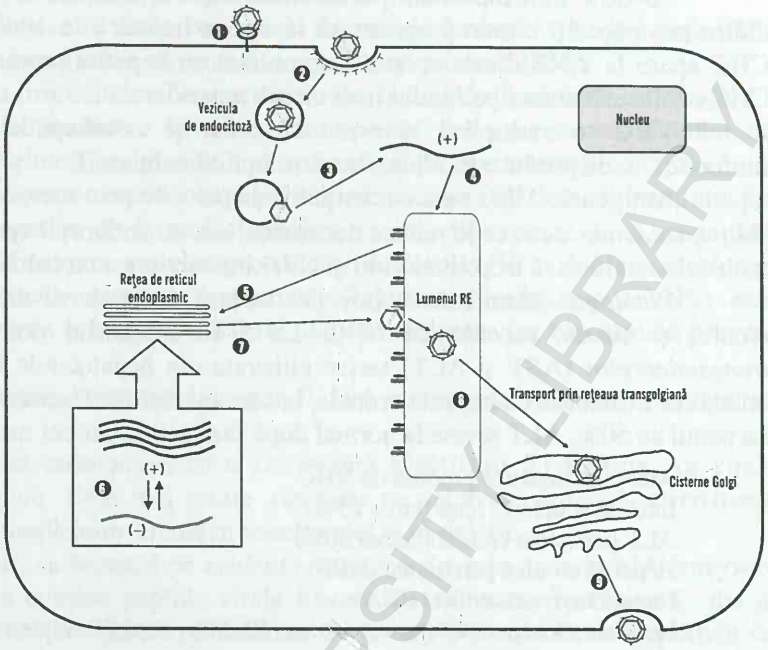


Fig. 404. Ilustrarea schematică a ciclului de multiplicare a VHC. 1. VHC se leagă de un receptor membranar (glicozaminoglicani sau receptorul pentru LDL), cu rolul de liganzi virali. 2. Virusul este înglobat în vezicule de endocitoză tapetate cu clatrină. 3. După ce peplosul fuzionează cu membrana veziculei de endocitoză în mediul acid al endosomului, capsida se dezagregă şi genomul este eliberat în citoplasmă. 4. Genomul ARN este tradus la nivelul cisternelor reg. 5. La locul multiplicării, cisternele reg se organizează într-o rețea compactă. 6. In rețeaua membranară are loc transcrierea ARN genomic de polaritate pozitivă, de pe matrița de polaritate negativă. Noile catene de polaritate pozitivă sunt traduse în proteine, sunt utilizate pentru replicarea ARN sau se împachetează în noile capside. 7. Asamblarea are loc în cisternele reg, unde sunt inserate proteinele peplosului. Se crede că virionii înmuguresc în lumenul reg. Virionii progeni sunt exportați pe calea de secreție a cisternelor golgiene (8) şi sunt eliberați (9) după ce veziculele de transport fuzionează cu membrana plasmatică.

In vivo, cantitatea de virus produsă de celulele infectate este mult mai mare, ceea ce reflectă existența unor deosebiri majore ale mediului celular *in vitro* şi *in vivo*. Multiplicarea *in vivo* este stimulată de un set de citokine şi factori de creştere, care se găsesc în ficat, dar lipsesc *in vitro*.

Cimpanzeul este singurul model experimental pentru infecția cu VHC. Inocularea iv reproduce infecția şi hepatita acută.

În celulele *hepatice* infectate şi în *mononuclearele* periferice s-au detectat catene de polaritate pozitivă şi negativă prin metoda hibridării *in situ*. Se pare că nu există forme de replicare dublu catenare. Catena de polaritate negativă are rolul de matriță pentru sinteza noilor catene de polaritate pozitivă: unele vor fi molecule genomice, iar altele vor fi traduse în proteine.

Epidemiologie. Principala modalitate de transmitere a VHC (90%) este cea *parenterală*: transfuzia sângelui şi injectarea derivatelor sale. Omul este singura gazdă a virusului. Unele profesii (stomatologii) prezintă un risc crescut de infecție. Mai rar VHC se transmite pe *cale sexuală* prin lichidul spermatic (ceea ce explică frecvența mai mare a infecției la prostituate şi homosexuali) şi congenitală (transplacentară). Riscul infecției creşte pentru cei care se tatuează, pentru cei care-şi injectează iv droguri cu ace infectate şi pentru cei care fac dializă renală. Infecția post-transfuzională cu VHC are o evoluție mai agresivă decât cea dobândită prin injectarea iv a drogurilor, probabil datorită dozei de virus inoculat. Transplantul de organe de la donorii infectați cu VHC poate transmite infecția, dar corneea (avasculară) nu poate transmite VHC.

Majoritatea infecțiilor acute cu VHC sunt subclinice. Circa 30% din numărul infecțiilor sunt asociate cu simptome nespecifice: durere abdominală, inapetență, stare de oboseală şi de rău general.

Perioada de incubație a infecției cu VHC este de 15–75 de zile, interval în care ARN devine detectabil în ser prin RT-PCR. Titrul viral atinge 10^5–10^7 molecule genomice/ml între 6–10 săptămâni.

Faza acută a infecției, cu viremie, poate să se manifeste mai devreme, dar testele disfuncției hepatice devin anormale după acest interval. Creşte nivelul aminotransferazelor, datorită eliberării lor din hepatocitele lezate, la 5–10 săptămâni post-infecție. Creşterea ALT este asociată cu prezența ARN viral în plasmă, iar normalizarea valorilor ALT, se corelează cu dispariția ARN. Faza acută a infecției poate dura 2–4 luni, *cu viremie*. Rareori produce hepatită acută (7/100 000 cazuri). Infecția este complicată de alcoolism şi de infecția cu alte virusuri hepatitice.

Infecția progresează lent, este asimptomatică până la decompensarea ficatului şi produce chiar CHC.

BUCHAREST MEDICAL UNIVERSITY LIBRARY

50–80% dintre pacienții infectați cu HCV evoluează la starea de purtător cronic. Circa 30% dintre cei infectați cronic progresează la ciroză hepatică în 10–30 de ani după infecție primară, iar CHC apare la 2,5% dintre aceştia. În contrast cu hepatita cronică B, la pacienții infectați cu VHC, CHC evoluează numai pe fondul unei ciroze anterioare.

VHC se multiplică în *hepatocite*, dar şi extrahepatic (în macrofage şi posibil chiar în limfocite), unde produce ECP, iar *in vitro*, în linii celulare T.

Antigenele VHC s-au evidențiat în hepatocite prin metoda IF. In sânge virionii se asociază cu *β-lipoproteinele*, ceea ce le reduce densitatea, sau cu anticorpii specifici şi densitatea lor creşte. Aceste molecule modulează tropismul viral şi chiar interacțiunea cu celulele.

Patologie. Manifestările infecției variază de la starea de purtător inaparent, până la hepatita cronică şi ciroză, asociată cu CHC. La 5–10 săptămâni post-infecție începe să crească nivelul *transaminazelor* (AST şi ALT) serice eliberate din hepatocitele lezate. Mai mult de 50% din totalul infecțiilor evoluează ca hepatite cronice, la care nivelul ALT serice oscilează şi pacienții rămân viremici. La restul de 50%, ALT revine la normal după faza acută, dar cei mai mulți pacienți rămân viremici.

Afecțiuni hepatice produse de VHC
Infecție acută ---- Icter (circa 25%)
ALT persistent crescută (circa 50%)
Hepatită cronică persistentă (HCP)
Hepatită cronică activă (HCA)
Insuficiență hepatică datorată cirozei (10-20%) după 20-30 de ani şi CHC primar după alți 10 ani.

Histologic, hepatita C este asociată cu:
- apariția foliculilor limfoizi în spațiile portale;
- infiltrat al celulelor inflamatorii în sinusoidele lobulare;
- depozite lipidice mari în hepatocite (steatoză);
- necroza hepatocitelor şi fibroză (depozite de colagen) cu grade diferite.

Pacienții cu *hepatită C cronică*, pe baza nivelului ALT crescut, cu sau fără simptome clinice au *hepatită cronică persistentă*, cu titru viral mic şi valori moderat crescute ale transaminazelor (TA), sau *hepatită cronică activă* cu titru viral crescut şi valori ridicate ale *transaminazelor*, cu sau fără ciroză. Ciroza apare la 20% dintre cazuri şi duce la insuficiență hepatică la circa 20–25% dintre cazurile cirotice.

Țesutul hepatic este infiltrat cu limfocite TCD_4 şi TCD_8. Leziunile hepatice se datorează, cel puțin parțial, răspunsului imun, dar ECP direct datorat multiplicării HCV poate fi un factor important al patologiei, un semnal pentru infiltrarea şi recrutarea limfocitelor specifice în ficat.

Altă consecință a infecției cu VHC este CHC (carcinomul hepatocelular). Progresia de la hepatita cronică activă la ciroză şi eventual la CHC este lentă, cu un interval mediu între infecție şi declanşarea cirozei şi CHC de 21 şi respectiv 29 de ani.

Răspunsul imun este humoral şi celular. Imunitatea înnăscută este conferită de IFNα. In serul pacienților s-a evidențiat prezența Ac care *in vitro* inhibă multiplicarea virusului. Probabil au efect neutralizant şi *in vivo*. Sub acțiunea presiunii selective, în timp, apar noi variante genetice rezistente la acțiunea neutralizantă a Ac*.

* La un pacient agamaglobulinemic, secvențele hipervariabile ale genomului VHC au rămas neschimbate timp de 2–5 ani, ceea ce sugerează că noile variante genetice şi antigenice apar ca rezultat al presiunii selective a RI.

Infecția acută cu VHC este controlată de RIMC specific față de antigenele VHC. Limfocitele TCD_4 şi TCD_8 se activează policlonal şi recunosc epitopi asociați cu moleculele CMH II şi respectiv CMH I. La pacienții cu infecție cronică, răspunsul IMC este oligoclonal. Limfocitele Tc recunosc epitopii proteinei C şi ai proteinelor E_1 şi E_2.

Infecția cu VHC este *persistentă de tip cronic* (productivă). Problemele majore ale patologiei VHC sunt *persistența infecției şi sensibilitatea la reinfecție,* generate de mai multe cauze:

– RIMH față de proteinele învelişului viral este *ineficient*. Proteinele C şi NS_3 sunt foarte antigenice şi activează ambele compartimente ale RI. Dar RI nu este suficient de protector din mai multe cauze:

– rata de multiplicare a virusului depăşeşte capacitatea de răspuns imun;
– prezentarea neadecvată a antigenelor virale, ce se poate datora interferenței VHC cu funcția CD;
– deleția celulelor TCD_4 sau anergia lor, devenind incapabile să producă IFNγ;
– VHC favorizează apoptoza limfocitelor Tc specific virale, indusă de ligandul Fas (CD_{95});
– Ac nu neutralizează infecțiozitatea virionilor. Ineficiența lor s-ar datora faptului că glicoproteinele de înveliş sunt foarte *glicozilate* şi astfel epitopii antigenici sunt mascați;
– apariția *noilor variante antigenice* este decisivă pentru incapacitatea RI de a elimina infecția. Izolatele de virus, chiar a celor succesive de la acelaşi pacient cu infecție cronică au o accentuată variabilitate antigenică. Genele codificatoare ale glicoproteinelor de înveliş (E_1 şi E_2) au o rată mai mare de variație mutațională decât alte secvențe genomice. Regiunea N-terminală E2/NS1 este hipervariabilă. Glicoproteinele sunt ținta principală a RIMH, dar variabilitatea lor biochimică permite evitarea acțiunii Ac.

Clinic, schimbările în regiunile hipervariabile pot fi fără consecințe sau sunt asociate cu episoade distincte de hepatită.

VHC declanşează manifestări *autoimune*, ca o consecință a activării RI față de Ag virale expuse pe suprafața celulelor hepatice. Cele mai multe afecțiuni se datorează infecției *persistente cronice*, cu formarea şi depunerea complexelor imune în vasele mici şi în rinichi.

Diagnosticul infecției cu VHC se bazează pe *evidențierea Ac serici* prin metoda EIA (enzyme-linked immunosorbent assay). Trusa conține peptide virale lineare recombinante (proteina C, dar şi NS_3, NS_4 şi NS_5) codificate de secvențele genice, sintetizate de levuri. S-a considerat important ca kiturile să conțină mai multe antigene pentru detectarea Ac serici, deoarece există diferențe de reactivitate imunitară a pacienților față de diferite proteine ale VHC. Trusele cu Ag multiple au crescut eficiența diagnosticului pentru detectarea seroconversiei timpurii. Intervalul seroconversiei este variabil: între 7–31 săptămâni după infecția prin transfuzie. Performanțele truselor de diagnostic au evoluat şi au atins eficiența de aproape 100%. Testarea donorilor de sânge a evidențiat o rată a infecției de 0,2–0,5 în Europa de nord şi de 1,2–1,5% în sudul Europei şi Japoniei. Mulți dintre cei pozitivi au antecedente de risc al transmiterii parenterale: transfuzie, primitori de produse derivate din sânge, injectarea iv a drogurilor.

VHC produce viremie, dar pentru că virusul seric are un titru scăzut, nu s-a elaborat o metodă directă pentru evidențierea Ag virale. Viremia se monitorizează cu un grad înalt de sensibilitate, prin tehnica PCR a ADNc pentru detectarea ARN viral. Capătul 5' al ARN genomic al VHC este ideal pentru RT-PCR, deoarece este bine conservat la diferitele izolate virale. Se folosesc primeri oligonucleotidici cu secvență conservată, urmată de hibridarea cu o probă marcată. Metoda detectează ARN la nivelul câtorva zeci de copii/ml ser. Astfel, viremia se detectează la numai câteva zile după infecție.

Terapia VHC se bazează pe administrarea sistemică a IFNα recombinant. Sterilizarea organismului de VHC se produce numai la 20% dintre pacienții tratați, dar asocierea IFNα cu *ribavirină** este eficace în 40% dintre cazurile tratate. Tratamentul se adresează cazurilor acute sau cronice.

* Ribavirina este o nucleozidă purinică sintetică, asemănătoare guanozinei şi inozinei.

Imunosupresia cu corticosteroizi scade nivelul aminotransferazei serice, deşi titrul viral seric creşte, iar după stoparea imunosupresiei, maladia cronică a ficatului se exacerbează, ceea ce sugerează rolul imunității în producerea leziunilor hepatice.

Vaccinul protector ar trebui să conțină antigene de la serotipuri multiple pentru a oferi o protecție globală. Bariera insurmontabilă pentru obținerea unui vaccin eficient este variația antigenică a multor agenți patogeni care prezintă o diversitate antigenică înaltă. Dacă toate variantele antigenice ar fi cuprinse în vaccin, doza devine prea mare, cu riscul efectelor secundare adverse. Vaccinurile subunitare obținute prin tehnici de inginerie genică sunt promițătoare.

Bibliografie

Santolini E., Migliaccio G., La Monica N. 1994. Biosynthesis and Biochemical Properties of the Hepatitis C Virus Core Protein. Journal of Virology vol. 68, no. 6: 3631–3641.

Howard C. R., Zuckerman A. J. 1990. Viral Hepatitis, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.
Cuthbert J. A. 1994. Hepatitis C: Progress and Problems – Clinical Microbiology Reviews. vol. 7, no. 4, pp. 505–532.
Houghton M. 1996. Hepatitis C Viruses, în vol. Fields Virology, third ed. ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincot – Raven Publishers, Philadelphia.
Blaine Hollinger F. 1990. Non-A, non-B Hepatitis Viruses, în vol. Virology, sec. ed., ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.
Irving W. L. 1998. Hepatitis C Virus, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.
Simmonds P., Mutimer D. 1998. Hepatitis C Virus, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, vol. IV Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier, 1998.
Zein N. N. 2000. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes – Clin. Microbiol. Rev. 13, 223–235.
Patick A. K., Potts K. E. 1998. **Protease Inhibitors as Antiviral Agents** – Clin. Microbiol. Rev. 11: 614–627.
Dustin L., Rice C. M. 2007. Flying Under the Radar: The Immunobiology of Hepatitis C – Annu. Rev. Immunol. 25, 51–69.
Carter J. B., Saunders V. A. 2007. Virology: Principles and Applications John Wiley & Sons, Ltd.
Peters C. J., Dalrymple J.M. 1990. *Alphaviruses*, în vol. Virology, sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.
Schlesinger S., Schlesinger M. J. 1991. Replication of *Togaviridae* and *Flaviviridae*, în vol. Fundamental Virology, Second Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.
Rice C. M. 1996. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
Gubler D. J., Roehrig J. T 1998. Arboviruses (*Togaviridae and Flaviviridae*), în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.
Henchal E. A., Putnak J. R. 1990. The Dengue Viruses – Clin. Microbiol. Rev. 3, 4, pp. 376–396.
Gubler D. J. Burns J.A. 2008. Dengue Viruses, în vol. Desk Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.
Chambers T. J. 2008. Flaviviruses: General Features, în vol. Desk Encyclopedia of Human Medical Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, 2008 AP.
Batenschlager R., Buhler S. 2008. Hepatitis C Virus, în vol. Desk Encyclopedia of Human Medical Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

21.7. *Familia Asfarviridae* (Africa swine fever and related viruses)

Virusul febrei suine africane este singurul arbovirus cu genom ADN, unicul membru al acestei familii, agentul etiologic al bolii hemoragice, o maladie letală a porcului domestic.

Virionul cu diametrul de 175–215 nm, are o structură complexă:

- regiune centrală nucleoproteică (nucleoid), de 70–100 nm diametru, acoperită de un strat proteic gros. Regiunea centrală este înconjurată de două straturi lipidice interne, derivate din cisternele reticulului endoplasmic;
- capsidă icozaedrică formată din 1892–2172 capsomere, de 170–190 nm, cu un înveliş lipidic extern, ce se formează odată cu înmugurirea prin membrana citoplasmatică.

ASFV se aseamănă cu alte virusuri ADN cu multiplicare nucleo-citoplasmatică: *Pox-, Irido-, Phycodnaviridae*. Genomul este o moleculă de ADN dublu catenar, capetele închise covalent, cu secvenţe inversate repetate terminal. Virionul conţine peste 50 de proteine, inclusiv ARN-polimeraza. Informaţia este transcrisă în circa 150 cadre de citire, de pe ambele catene. Virusul se multiplică în citoplasmă, în situsuri discrete perinucleare (fabrici de virus).

Sinteza ARN este catalizată de enzimele regiunii centrale. Copiile sunt bonetate (5') şi poliadenilate (3').

În Africa sub-sahariană, ASFV se menţine în ciclul natural fiind transmis între porcul sălbatic şi căpuşa *Ornithodorus*. Ambele sunt gazde naturale infectate persistent. La porcul sălbatic tânăr, viremia este înaltă, iar la adulţi are titru scăzut şi infecţia este asimptomatică. Căpuşele *Ornithodorus* transmit infecţia atât pe orizontală, cât şi pe verticală, transovarian.

La porcul domestic ASFV produce infecţii variate, de la cele subclinice, până la cele cu mortalitate înaltă, în funcţie de factorii de virulenţă ai agentului infecţios şi de reactivitatea imunitară a gazdei. Virusul se multiplică în macrofage. Macrofagele infectate eliberează citokine (TNF-α), care induc apoptoza limfocitelor şi a megacariocitelor în măduvă. Limfocitele nu sunt permisive pentru multiplicarea virusului. Apoptoza limfocitelor în splină, ganglioni limfatici, în timus determină imunodeficienţa.

21.8. Familia Togaviridae

Familia *Togaviridae* (toga = înveliş strâns ajustat) reuneşte cei 26 reprezentanţi ai g. *Alphavirus,* adică togavirusurile transmise de artropode, de importanţă medicală (Sindbis, SFV = Semliki Forest Virus, *virusurile encefalitice equine*) şi g. *Rubivirus.* Sunt cele mai simple virusuri învelite. Capsida are simetrie icozaedrică, iar capsomerele sunt formate din molecule proteice identice. Genomul şi proteinele asociate formează *nucleocapsida*, învelită de un peplos, derivat din membrana plasmatică a celulei.

La suprafaţa învelişului proemină spiculele glicoproteice: E_1 şi E_2 formează un *heterodimer.* Spiculul proeminent pe suprafaţa virionului este format din 3 heterodimeri.

Togavirusurile produc zoonoze importante, omul fiind infectat de vectorul din rezervorul animal. Au un spectru larg de gazdă: infectează vertebratele şi artropodele vectoare hematofage. *In vitro* se multiplică în liniile celulare de mamifere şi de artropode.

Multiplicarea are loc în citoplasmă. Ataşarea virusului în celulele culturii este dependentă de pH şi de concentraţia ionică a mediului. Virionul se fixează prin intermediul spiculelor glicoproteice proeminente la suprafaţa învlişului. Anticorpii specifici faţă de glicoproteina E_2 neutralizează infecţiozitatea.

Receptorii de virus sunt multipli: proteine, oligozaharide, lipide. Moleculele CMH (H-2 la şoarece şi HLA la om) pot avea rolul de *receptori* prin care virusul se fixează la suprafaţa celulei, dar prezenţa lor nu este esenţială pentru infecţie, deoarece virusul foloseşte şi alţi receptori membranari. Virionul pătrunde în celulă pe calea *endocitozei mediată de receptori* (EMR). Acidifierea veziculei de endocitoză determină fuziunea învelişului viral cu membrana veziculei, eliberând nucleocapsida în citoplasmă şi dezvelirea genomului ARN. Aminele lizosomotrope ridică pH al veziculelor de endocitoză şi inhibă multiplicarea virală.

Alfavirusurile pot să pătrundă direct, prin *fuziunea învelişului* cu membrana plasmatică.

ARN genomic funcţionează ca ARNm. ARN-polimeraza codificată de virus transcrie ARN genomic într-o catenă negativă, cu rol de matriţă pentru ARN genomic progen.

Genomul este o moleculă de ARN mc de polaritate pozitivă. La *Alphavirus* conţine circa 11703 nucleotide, la care se adaugă 59 nucleotide netraduse la capătul 5' şi secvenţa poli-A (322 nt) la capătul 3'. Capătul 5' este metilat (cu metil-7G). Genomul este organizat în 2 domenii şi *8 unităţi de transcriere.*

Domeniul *nestructural* ocupă cele 2/3 ale capătului 5' şi codifică proteine *nestructurale* şi de replicare, iar domeniul *structural* formează 1/3 terminală a capătului 3' şi codifică proteinele *structurale.* Proteinele NS sunt traduse ca 1 sau 2 poliproteine chiar din ARN genomic, clivate în proteine nestructurale (P_1-P_4).

Domeniul structural este tradus ca o poliproteină dintr-un ARNm subgenomic, de 26S, bonetat şi poliadenilat.

Proteinele *nestructurale* traduse chiar din ARN genomic, catalizează sinteza catenei ARN complementare de lungime completă (49 S).

ARN genomic de 49 S poate urma 3 căi de evoluţie:

- se asociază cu ribosomii şi este tradus la proteine NS;
- se asociază cu un complex de replicare şi este transcris în mai multe copii de ARN negativ;
- târziu în ciclul de multiplicare, când în celulă se acumulează o cantitate mare de proteine virale, ARN 49 S de polaritate pozitivă se asociază cu proteinele capsidale şi formează nucleocapsidele.

În celulă funcţionează 2 categorii de ARNm: cel de 49 S (tradus în proteinele NS) şi altul de 26 S, tradus într-o *poliproteină* ce va fi clivată în cele 5 *proteine structurale*: proteina capsidei, 2 *polipeptide* mici asociate genomului şi *glicoproteinele* peplosului. In poliproteină, proteina capsidei este N-terminală şi are activitate *serin-proteazică cis* pentru a se elibera pe sine din catena nascentă. Ulterior poliproteina se pliază şi expune legăturile peptidice ce urmează a fi clivate, spre situsul activ al enzimei, astfel încât proteoliza este foarte rapidă.

Cele *4 proteine NS*, ca produse finale, îndeplinesc diferite funcţii: nsP_1 este necesară pentru iniţierea sintezei ARN de polaritate negativă; nsP_2 – probabil pentru iniţierea transcrierii ARNm 26S; nsP_3 – funcţie necunoscută ; nsP_4 – este probabil ARN-pol virală.

Asamblarea şi înmugurirea presupune integrarea celor 3 elemente structurale ale virionului: nucleocapsida, învelişul lipidic şi spiculele glicoproteice. Asamblarea capsidei cu ARN 49 S are loc în apropierea membranei plasmatice, la situsurile de inserţie a glicoproteinelor virale.

Pe baza specificităţii serologice, alfavirusurile sunt grupate în 6 complexe antigenice: western equine encephalitic (wee), venezuelean (vee), eastern (eee), semliki forest (sfv), Middelburg şi Nadumu virus (Peters şi col. 1990). Fiecare complex cuprinde o singură tulpină de virus sau câteva variante.

Cultivare. In vitro, alfavirusurile se multiplică în embrionul de găină, dar şi în liniile celulare continui: BHK-21 şi VERO. Infecţia celulelor vertebratelor este *citolitică*, iar infecţia celor mai multe tipuri celulare de nevertebrate este *persistentă*, fără ECP evidente. În celulele enucleate de ţânţar, multiplicarea este foarte limitată, dar este aproape normală în celulele enucleate ale vertebratelor. Tratamentul îndelungat cu α-amanitină sau cu actinomicină D (inhibitori ai transcrierii) diminuează rata multiplicării, ceea ce denotă dependenţa de funcţiile nucleare.

Proteinele virale sintetizate în celulele insectelor au conţinut scăzut de glucide şi *nu au acid sialic*, pentru că celulele sunt lipsite de activitatea sialil-transferazei.

Unul dintre mecanismele inducţiei ECP poate fi creşterea concentraţiei ionilor de Na^+ în celulă, după infecţie, situaţie ce favorizează multiplicarea virală. Concentraţia crescută de Na^+ favorizează traducerea ARNm viral şi este inhibitorie pentru traducerea ARNm celular.

Patogeneză şi patologie. Alfavirusurile au un spectru larg de gazdă, reprezentat de păsări, rozătoare, primate şi mai rar equidele, lilieci, ţânţari, căpuşe, ce pot fi infectate atât natural, cât şi experimental. La vertebrate, multiplicarea primară are loc în celulele liniei mieloide şi limfoide sau în celulele endoteliului vascular. Răspunsul vertebratelor la infecţie este foarte variat, de la infecţia inaparentă (cu sau fără viremie detectabilă), până la *encefalita severă* cu sfârşit letal. Reptilele şi amfibienii sunt sensibile la infecţia experimentală cu alfavirus. Multiplicarea în SNC depinde de capacitatea virusului de a depăşi bariera hemato-encefalică şi de a infecta neuronii.

Cele mai multe infecţii naturale la păsări şi mamifere sunt inaparente. În faza viremică, de câteva zile, artropodele vectoare preiau virusul odată cu sângele.

La om, infecţia variază de la cea inaparentă, până la febra acută şi uneori cu maladii severe fulminante cu morbiditate şi mortalitate înalte. Organele infectate sunt muşchii striaţi, plămânul, ficatul, creierul, articulaţiile, sistemul fagocitar mononuclear. Infecţia este asociată cu encefalită (în Lumea nouă), cu febră, erupţie veziculară, poliartrită (în Lumea veche). De cele mai multe ori, infecţia este stopată înainte de a invada SNC. Neuroinvazia depinde de nivelul viremiei, de factori genetici ai gazdei, de răspunsul imun, de virulenţa virusului.

Multe infecţii ating proporţii epidemice. Rezervoarele de infecţie ale unor virusuri sunt animalele sălbatice: păsări rozătoare, primate, la care infecţia este inaparentă, dar uneori infecţia evoluează chiar letal. Alteori sursa majoră de infecţie este omul.

Calul este cel mai sensibil şi după infecţia cu *virusurile encefalitice western, eastern şi venezuelean* face o encefalită letală.

EEE (eastern equine encephalitis) este transmis de *Aedes sollicitans* – hematofag pentru păsări şi mamifere. Este transmis şi la om.

WEE (western equine encephalitis) produce encefalita la cal şi la om în vestul Americii de Nord.

VEE (venezuelean equine encephalitis) produce encefalita la cal şi la om în America centrală şi de sud. O epizootie din '69 (Peru) s-a propagat în Texas şi până în '71 a omorât 200.000 de cai.

De cele mai multe ori gazda vertebrată nu suferă o infecţie clinică.

Studiile experimentale sunt justificate atât pentru importanţa lor intrinsecă, cât şi pentru potenţialul patogen relevant al infecţiei umane. Rozătoarele se inoculează intracerebral. Animalele tinere sunt mai sensibile. Sensibilitatea la infecţie este condiţionată de factori imunitari, dar şi genetici. Virusul se multiplică în muşchii striaţi şi în muşchiul cardiac. Multiplicarea în neuroni produce liza.

Epidemiologie. Alfavirusurile sunt transmise în primul rând prin înţepătura ţânţarilor, dar şi de căpuşe. Sunt diseminate de păsările migratoare. Strategia de propagare este trecerea succesivă de la ţânţar la vertebrat şi din nou la ţânţar. De multe ori, omul este infectat accidental, fără semnificaţie

pentru propagarea virusului. Toate alfavirusurile patogene pentru om se multiplică şi sunt transmise de ţânţari. Vectorul se infectează fără patologie semnificativă. Alfavirusurile multiplică în tubul digestiv la ţânţarii *Aedes aegypti, Culiseta melanura, Culex tarsalis*, dar ajung şi în glandele salivare.

La om, infecţia are grade diferite de severitate: de la cea asimptomatică până la cea letală. De cele mai multe ori infecţia este subclinică sau determină o stare febrilă tranzitorie.

Unele produc infecţii ale SNC, iar altele sunt asociate cu o patologie articulară. Incubaţia este scurtă şi este asociată cu viremie, ce durează câteva zile: febră, dureri de cap, mialgii, leucopenie.

După o singură infecţie se instalează imunitatea protectoare, atât humorală, cât şi celulară. Nu se cunoaşte mecanismul prin care anticorpii elimină infecţia din neuroni. În ariile endemice, imunitatea se consolidează prin infecţiile repetate inaparente.

Pentru *diagnosticul* infecţiei cu alfavirusuri se folosesc mai multe metode :

- *izolarea* virusului în cultură, posibilă în faza acută, în primele 48 de ore, când lipsesc anticorpii specifici. Ulterior, cantitatea de virus în ser scade rapid şi izolarea devine tot mai dificilă. Virusul se poate izola prin inocularea intracerebrală a puilor sugari de şoarece sau în celule Vero (de rinichi de maimuţă) şi culturi de celule de ţânţar;
- *detectarea Ac* specifici în ser. Toate alfavirusurile sunt înrudite antigenic şi dau reacţii încrucişate în tehnicile de imunodiagnostic. Reacţiile de HAI (hemaglutinoinhibare), ELISA şi imunofluorescenţă au definit 8 serogrupuri de alfavirusuri, 4 dintre ele fiind *wee, vee, eee, SFV* (Semliki Forest virus);
- tehnicile moleculare pentru detectarea genomului viral. Reacţia PCR foloseşte ADNc al ARN genomic;
- determinarea secvenţei de nucleotide sau reacţia de neutralizare cu anticorpii specifici monoclonali sunt metodele pentru identificarea virusului.

g. ***Rubivirus***, agentul rubeolei umane (denumirea semnifică aspectul roşietic al leziunilor tegumentare), o infecţie benignă, este singurul reprezentant al genului clasificat în familia *Togaviridae*.

Virionii sunt pleomorfi, mai ales sferici, de 60–70 nm. Regiunea centrală electrono-densă este separată de învelişul lipidic printr-o zonă electrono-clară. La suprafaţa învelişului proemină spiculele (E_1 şi E_2). E_1 este mai expus decât E_2, este hemaglutinant, are rol de ligand şi este imunodominant.

Structura, compoziţia şi organizarea genomului sunt asemănătoare cu acelea ale alfavirusurilor. ARN genomic (9762 nt) de 40S este 5'bonetat şi 3' poliadenilat, având rol de mesager pentru sinteza proteinelor NS şi matriţă pentru sinteza unui ARN de polaritate negativă. Genomul este organizat în două ORF: cel proximal capătului 5' codifică cele 2 proteine NS, iar ORF proximal capătului 3' codifică proteinele structurale (C – capsida), E_1, E_2. Proteinele structurale sunt traduse ca un polipeptid precursor.

Virusul rubeolei (VR) se aseamănă cu *Alphavirus* pentru că are ca genom o moeculă de ARN mc de polaritate pozitivă, capsida quasisferică alcătuită dintr-o singură proteină (C), ce formează dimeri prin legături S-S, iar învelişul are două tipuri de spicule (E_1 şi E_2). Nu are ca vector un artropod şi nu este un arbovirus. Este distinct din punct de vedere antigenic de alfavirusuri. Rezervorul natural de virus este omul. Nu are alte gazde naturale. Nu se multiplică în culturile celulare de insecte, dar se multiplică lent (8–12 zile) la un titru scăzut, în celulele liniei VERO (AGMK), RK-13 (rinichi de iepure), BHK-21, fără ECP detectabil. De aceea, infecţiile persistente sunt comune şi nu pot fi eliminate cu Ac specifici pentru că virionii înmuguresc din membranele reticulului endoplasmic sau din cisternele Golgi.

VR este foarte bine adaptat pentru infecţiile persistente. Se transmite prin aerosoli. Situsul primar al multiplicării este epiteliul mucoasei bucale, al tractului respirator superior şi ţesutul limfoid nazofaringian. Virusul se diseminează, pe cale limfatică, în ganglionii limfatici regionali, unde se multiplică. După 7–9 zile, virusul ajunge în sânge. Viremia dispare după sinteza Ac specifici, la scurt timp după erupţia tegumentară eritematoasă. In perioada erupţiei, pacienţii sunt infecţioşi. Multe infecţii sunt asimptomatice, iar cele clinice au simptome uşoare.

În timpul sarcinii, ţesutul placentar este foarte sensibil la infecţie. Virusul se multiplică, rezultând focare necrotice şi leziuni ale endoteliului vascular. Din placentă, virusul se poate disemina în ţesuturile fătului, unde poate infecta aproape toate organele. Leziunile fetale severe sunt produse de

virusul *rubeolei* în primele 3 luni de dezvoltare. Manifestarea dramatică a procesului infecțios este *aspectul teratogen*. Infecția organismului matern în perioada primului trimestru al sarcinii prezintă un risc foarte mare de infecție pentru făt (spre 100%), asociată cu *sindromul congenital al rubeolei* (CRS). Rata CRS este mai mare de 50% dacă fătul este infectat în prima lună de sarcină, de 25% pentru luna a II-a şi de 10% pentru cea de a III-a lună. După 3 luni de sarcină, eficiența transferului placentar al VR diminuează. Infecția fătului este cronică, nelitică, asociată cu anomalii congenitale multisistemice. La 18–20 de săptămâni, fătul infectat produce IgM, iar IgG matern traversează placenta, dar nu inhibă multiplicarea virusului. Infecția maternă nu duce totdeauna la CRS. Manifestările clinice ale CRS la naştere sunt variate: purpura trombocitopenică, întârzierea creşterii intrauterine, malformații cardiace, întârziere psihomotorie, defecte oculare (cataractă, glaucom, retinopatie), surzenie, hepato/splenomegalie. Cea mai comună malformație este surzenia. Consecințele pe termen lung ale rubeolei congenitale se reflectă în disfuncții endocrine (pancreasul, creind condiții pentru diabetul insulino-dependent – IDDM, tiroida) sau rareori, o maladie neurodegenerativă progresivă fatală (panencefalita progresivă rubeolică – PRP). Encefalita post-infecțioasă ce poate însoți rubeola acută ar avea cauză autoimună, pentru că virusul nu s-a izolat din LCR şi nici din creier (Frey, 2008). În țesuturile fetale, proporția celulelor infectate este $1/10^3$–10^5, dar efectele sunt profunde, deoarece diviziunea celulară este inhibată, ducând la întârzierea şi alterarea dezvoltării. Creierul pacienților CRS nu are malformații vizibile, dar tendința este spre microcefalie.

80% dintre copiii infectați congenital elimină virus pentru 10–15 luni după naştere.

La adolescenți şi la tineri, rubeola clinică se manifestă ca o erupție maculopapulară, adenopatie, febră uşoară, conjunctivită, dureri în gât, artralgie. Erupția eritematoasă tegumentară este cea mai evidentă şi apare la 16–20 de zile, inițial pe față, ulterior pe trunchi şi membre.

Patologia VR se produce prin 2 mecanisme: ECP direct, care poate induce apoptoza şi prin inhibiția diviziunii celulare.

Analiza secvenței de nucleotide a evidențiat existența a două variante genetice, dar secvența aminoacizilor diferă numai în proporție de 1–3% şi nu se disting antigenic.

După infecția acută, se sintetizează IgM pentru 1–2 luni. Detectarea IgM este modalitatea curentă de diagnostic a infecției acute. Ulterior se sintetizează IgG şi IgA. IgG_1 persistă pe termen lung după infecția naturală.

Bibliografie

Peters C. J., Dalrymple J. M. 1990. *Alphaviruses*, în vol. Virology, sec. edition, ed. by B. N.Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Schlesinger S., Schlesinger M. J. 1991. Replication of *Togaviridae* and *Flaviviridae*, în vol. Fundamental Virology, Second Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Gubler D. J., Roehrig J. T. 1998. *Arboviruses (Togaviridae* and *Flaviviridae)*, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Wolinsky J. S. 1990. *Rubella (Togavirus)*, în vol. Virology, Sec. ed., Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Strauss J. H., Strauss E. G. 1994. The alphaviruses: gene expression, replication and evolution. Microbiol. Rev. 58(3): 491–562.

Miller B. R. 2008. *Arboviruses*, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Frey T. K. 2008. *Rubella* virus, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Tulman E. R., Delhon G. A., Ku B. K., Rock D. L. 2009. African Swine Fever Virus – Current Topics in Microbiol. and Immunol., vol. 328, 2009, Editor James van Etten, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

21.9. Familia Bunyaviridae

Familia *Bunyaviridae* cuprinde mai mult de 300 de virusuri, majoritatea transmise de artropode. Au formă sferică cu diametrul de 80–120 nm, învelite. Învelişul derivă din membranele intracelulare sau din membrana citoplasmatică, în care proemină peplomerele (spicule) codificate de virus.

Cele circa 300 de virusuri infecțioase pentru om şi animale ale familiei *Bunyaviridae* sunt grupate în 4 genuri, pe criterii serologice: *Orthobunyavirus* (Bunyamwera virus), *Phlebovirus*

(denumire derivată de la *Phlebotomus papatasii,* artropodul vector), *Nairovirus* (Nairobi sheep disease virus) şi *Hantavirus* (Hantan virus). Virusurile s-au descoperit în studiile pe artropodele hematofage. Unele sunt patogeni importanţi pentru om şi animale, dar majoritatea nu au importanţă medicală sau veterinară. *Orthobunyavirus* şi *Phlebovirus* sunt transmise de artropode. Ele produc infecţii benigne, febrile, mai rar infecţii ale SNC şi febră hemoragică. *Hantavirus* produce febra hemoragică cu sindrom renal (HFRS) sau sindromul pulmonar. Este transmis la om prin inhalarea aerosolilor de urină, fecale, salivă de şoarece. *Nairovirus* este agentul febrei hemoragice, cu mortalitate de 50%. Este transmis de căpuşe din g. *Ixodes*.

În alcătuirea virusului (fig. 405) intră 3 proteine majore: spiculele G_1 şi G_2 şi nucleoproteina capsidei (proteina N). Cea de a IV-a proteină structurală are funcţie de ARN-polimerază (proteina L).

Genomul este ARN mc, alcătuit din 3 segmente: *L*, (Large), *M* (Medium), *S* (Small). Fiecare segment genomic formează o nucleocapsidă individuală în virion, toate cele 3 fiind acoperite de un peplos comun. ARN genomic are polaritate negativă, dar segmentul S al g. *Phlebovirus* este ambisens, adică are proprietatea de codificare bidirecţională, ce se regăseşte numai la ARN al arenavirusurilor. Segmentul *L* codifică ARN-polimeraza, segmentul *M* – proteinele G şi NSm, iar segmentul *S* codifică proteinele N şi NSs.

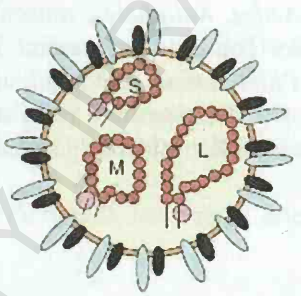


Fig. 405. Organizarea structurală a unui bunyavirus. Genomul este alcătuit din 3 segmente (L, M, S). ARN genomic este asociat cu proteina majoră (N) şi cu ARN-polimeraza (L). Pe suprafaţa virionului proemină spiculele celor două glicoproteine (după R. M. Elliot, 2008).

Primele 8–13 nucleotide la capetele 3' ale segmentelor genomice ARN au o secvenţă complementară (palindromică) cu cea de la capetele 5'. În consecinţă, segmentele se găsesc într-o conformaţie circulară laxă rezultată prin împerecherea nucleotidelor celor două extremităţi, dar nu sunt legate covalent.

Natura segmentată a genomului sugerează că există potenţialul reasortării în cazul co-infecţiei. Mecanismul reasortării a contribuit, probabil, la diversificarea genetică a acestui grup.

Multiplicarea. Virusurile se leagă prin intermediul glicoproteinelor de înveliş, pe receptorii celulelor sensibile şi sunt internalizate prin endocitoză. Se multiplică în citoplasmă şi se maturează prin înmugurire în membranele reticulului endoplasmic. Virionii sunt transportaţi în vezicule citoplasmatice, care fuzionează cu membrana şi eliberează virusul. Virionii pot să înmugurească direct din membrana plasmatică.

Glicoproteinele G_1 şi G_2, *in vitro* mediază hemaglutinarea, iar *in vivo* induc sinteza anticorpilor neutralizanţi. Anticorpii anti-proteina N fixează C.

Patologie. Bunyavirusurile produc infecţii, de la cele inaparente, trecând prin cele moderate, până la cele severe asemănătoare celei gripale, cu sau fără erupţie maculo-papulară, asociate cu febră, dureri de cap, mialgie, artralgie, frisoane sau encefalită, febră hemoragică cu hepatită necrotică. Unele bunyavirusuri produc encefalită transmisă de ţânţari, la om şi la animale, iar altele produc febră hemoragică.

În Europa şi Asia, *Hantavirus* produce febra hemoragică* cu sindrom renal (HFRS), iar în America produce un sindrom respirator acut fatal (HPS =sindrom pulmonar Hanta).

* Febrele hemoragice transmise de rozătoare sunt produse de reprezentanţi ai familiilor *Bunyaviridae, Arenaviridae* şi *Filoviridae.*

Diagnosticul infecţiei cu bunyavirusuri se pune utilizând metodele clasice: izolarea şi identificarea agentului infecţios şi evidenţierea răspunsului imun specific. Unele se multiplică în celulele liniei Vero, dar multe nu lizează celulele, ci le infectează persistent. Prezenţa lor se demonstrează prin metoda IF.

Majoritatea virusurilor s-au izolat prin inocularea intracerebrală a puilor sugari de şoarece, deoarece, la animalele mature bunyavirusurile produc infecţie cronică şi inaparentă. Unele sunt patogene pentru animalele tinere (şoareci şi hamsteri), chiar prin inoculare periferică. Sensibilitatea, specificitatea şi rapiditatea acestor metode sunt nesatisfăcătoare, ceea ce impune utilizarea metodelor serologice moderne şi a celor moleculare.

Bunyavirusurile nepatogene pentru rozătoare se izolează după evidențierea antigenelor în țesuturile gazdei. Unele se izolează prin inocularea culturilor celulare de țânțar sau chiar a țânțarilor. Izolarea trebuie confirmată prin metode serologice.

Pentru unele infecții, diagnosticul este rapid prin evidențierea Ag virale în sânge sau în țesuturi, prin metoda ELISA sau IF.

Transmitere. Fiind arbovirusuri, bunyavirusurile produc viremie cel puțin la o specie de vertebrate şi permit infecția vectorilor hematofagi. Se multiplică la artropode şi infectează glandele salivare, de unde sunt transmise la alte gazde vertebrate. Virusurile sunt transmise de diptere (*Culex, Aedes, Anopheles*, musculițe) şi pot produce infecții sporadice, dar pot să producă epidemii explozive în condiții de mediu favorabile dezvoltării vectorilor. Alte bunyavirusuri sunt transmise de *Phlebotomus papatasii*, un dipter de câțiva milimetri.

În sezonul rece, arbovirusurile se mențin prin infecția persistentă a vertebratelor, prin hibernarea vectorilor infectați. Unele bunyavirusuri sunt transmise de țânțari, pe verticală (transovarian).

Bibliografie

Schmaljohn C. S., Patterson J. L. 1990. *Bunyaviridae* and Their Replication, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Swanepoel R. 2004. *Bunyaviridae*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Elliot R. M. 2008. *Bunyaviruses:* General Features, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Carter J., Saunders V. 2007. Virology. Principles and Application, John Willey &Sons. Ltd.

21.10. Familia Arenaviridae

Este o familie mică, cu 14 membri. Denumirea (*arenos, arensos*, lb. latină = nisip, nisipos) semnifică aspectul granular-nisipos al virionilor în secțiune fină, pe imaginile electrono-optice, datorită faptului că ribosomii celulei sunt încorporați în mod obişnuit în virioni şi a fost aleasă pentru a evita confuzia Areno, cu Adeno.

Structură. Virionii sunt pleomorfi, morfologia tipică fiind cea sferică, cu diam. 90–110 nm. Sunt virusuri învelite cu peplos lipidic, pe suprafața cărora proemină spicule glicoproteice. Sunt sensibile la solvenții lipidici. Virionii se maturează prin *înmugurire* la suprafața celulei infectate. La locul înmuguririi, membrana celulei se îngroaşă, datorită glicoproteinelor virale care se inseră, iar ribosomii se aglomerează ordonat, adeseori circular şi aderă de membrană.

Din înveliş proemină *spiculii glicoproteici*, cu aspect butonat. In secțiunea fină a virionilor, la microscopul electronic, se observă un număr variabil de granule electrono-dense, ce seamănă cu ribosomii (20–30 nm diam). Din preparatele virale s-au izolat ribosomi şi subunități ribosomale, dar şi ARNr 28S, 18S şi 4–7S, caracteristice celulei. Ribosomii sunt funcționali, adică în sisteme acelulare, în prezența ARNm şi a factorilor specifici, sintetizează proteine. Nu se cunoaşte semnificația funcțională a prezenței lor în virioni.

Nucleocapsida constă din ARN genomic de *polaritate negativă*, asociat cu proteina N (nucleoproteina) şi apare sub forma a *2 structuri* circulare închise, deoarece capetele sunt asociate necovalent. Funcțional însă, ARN este *linear*, monocatenar, de polaritate negativă. Transcrierea catalizată de ARN-pol, trebuie să preceadă traducerea.

Genomul este format dintr-un *segment mare* (L), de 30–35 S şi unul *mic* (S), de 20–25 S. Cele două segmente se deosebesc prin secvența nucleotidelor (au informație genetică distinctă), nu au secvențe poli-A la capetele 3', iar capătul 5' nu este metilat. ARN genomic este asociat cu nucleoproteina (NP) şi are organizare helicală.

Diversitatea variantelor moleculare de ARN izolate din virioni denotă că în morfogeneza arenavirusurilor nu operează mecanismele de discriminare a componentelor proprii, atât de tipice pentru majoritatea ribovirusurilor. Nu se cunoaşte semnificația funcțională a componentelor celulare încorporate în structura virionului.

COPYRIGHT UNIVERSITY LIBRARY

Virionii pot fi diploizi, adică conțin 2 copii ale segmentelor L și S.

Pleomorfismul poate fi consecința acumulării ribosomilor la situsul membranar al maturării și al încorporării lor în număr variabil.

În preparatele virale, prin metoda EF s-au identificat 4 proteine majore:

– *nucleoproteina* (N), asociată genomului;

– *glicoproteină de înveliș* (GP), care se clivează în GP_1 și GP_2, proeminente pe suprafața peplosului;

– *proteina L*, neglicozilată, cu rol de ARN-pol;

– *proteină mică ce leagă Zn* (Z).

Capătul 3' al *ARN S* este transcris în ARNm și codifică *proteina N*, iar capătul 5' al ARN S este tradus direct în *proteina GP*.

Segmentul L codifică *proteinele Z* și *L*: capătul 3' este transcris în ARNm, iar capătul 5' este tradus direct în proteină. Aceasta este funcționalitatea *ambisens* a genomului, care constituie un mecanism de reglare a transcrierii genice.

Multiplicarea. Receptorii celulari pentru virus sunt *glicoproteine* membranare, iar virusul este înglobat prin EMR.

ARN-polimeraza virală inițiază sinteza ARN, pe matrițele genomice.

Trăsătura distinctivă a multiplicării arenavirusurilor este capacitatea de a produce *titruri înalte de virus progen*, cu perturbări minime ale proceselor vitale ale celulei. Multiplicarea virală este compatibilă cu supraviețuirea celulei (corespunde sistemului independent echilibrat). Sinteza macromoleculelor celulei nu este inhibată într-o măsură semnificativă și de aceea nu se produce ECP evident.

Ciclul de multiplicare este lent, comparativ cu al altor virusuri cu genom de polaritate negativă: în 2–3 zile este atins nivelul maxim al producerii de virus.

ARN L și S sunt transcrise în copii complementare, iar acestea au rol de matrițe pentru sinteza replicativă a ARN genomic. Perioada de latență între adsorbția virionilor infecțioși și apariția virionilor progeni în mediul extracelular este de până la 8 ore.

LCMV (virusul coriomeningitei limfocitare) este prototipul familiei și s-a izolat în anii '30, de la un pacient cu encefalită, deși infecțiile umane sunt rare, dar produce infecții la șoarece, șobolan, hamster. La gazda naturală (*Mus musculus, M. domesticus*) produce 2 tipuri de infecții:

– *infecție acută*, uneori mortală, corelată cu stimularea viguroasă a IMC, mediată de limfocitele Tc. RI omoară gazda prin meningită sau conferă rezistență. Celulele infectate cu virus sunt eliminate de limfocitele CD_8^+;

– *infecție persistentă*, corelată cu IMC slabă.

LCMV a constituit modelul pentru infecțiile virale persistente, ceea ce a permis formularea unor concepte cu privire la înțelegerea interacțiunii Ag virale cu sistemul imunitar și la consolidarea rolului IMC în apărarea antivirală.

Din anii '60, LCMV s-a folosit în studii experimentale ale IMC indusă de virusuri. Modelul experimental al LCMV a oferit paradigma efectelor pozitive și negative ale IMC mediată de limfocitele Tc, pentru că are 2 proprietăți importante:

– *in vitro nu este citopatic*, ceea ce permite aplicarea testului eliberării Cr la 15 ore, test în care liza celulelor se datorează exclusiv acțiunii limfocitelor Tc;

– stimulează un *răspuns amplu al IMC**, mediat de limfocitele Tc, cu intensitate maximă la 7 zile după infecție și produce liza celulelor infectate.

* Doherty și Zinkernagel (premiul Nobel) au demonstrat, la șoarecii infectați cu LCMV, că limfocitele lizează, *in vitro*, numai celulele singenice (liza este restrictivă în raport cu identitatea moleculelor CMH a limfocitelor efectoare și a celulelor țintă). Liza este detectată prin testul eliberării Cr.

Infecțiile persistente nu activează limfocitele Tc, pentru că celulele expun o cantitate minimă de Ag virale pe suprafața lor.

Arenavirusurile se multiplică într-o varietate largă de celule mamaliene (fibroblaste de primate și rozătoare), dar în mod curent se utilizează celulele BHK 21 și linii celulare de rinichi de maimuță (Vero).

Epidemiologie. Rezervorul natural al arenavirusurilor este reprezentat de rozătoare. Nu s-a evidențiat transmiterea nici unui arenavirus de către artropode.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Arenavirusurile infectează persistent rozătoarele şi sunt eliminate prin *excreta*. Şoarecii se infectează la naştere sau în perioada perinatală. La puii de şoarece, infecţia induce starea de toleranţă, este persistentă, fără efecte patologice şi fără răspuns imun dectectabil. Animalele rămân infecţioase pentru toată viaţa, elimină virusul în urină şi prin alte fluide. La gazdele naturale (rozătoare), transmiterea se face atât pe verticală, cât şi pe orizontală, prin salivă, lapte, urină. Omul se infectează prin contactul cu rozătoarele, prin praful contaminat cu urină, prin contaminarea alimentelor sau a apei. Fiecare tip de virus infectează o singură specie de rozătoare. La contactul cu tegumentul lucrătorilor, virusul pătrunde în mediul intern prin microleziuni. Unele virusuri (tulpinile Lassa, Junin, Machupo, Sabia, LCMV) produc febră hemoragică severă, iar altele infectează fătul cu efecte letale.

Patologie. Unele arenavirusuri produc boli hemoragice severe: febra de Lassa (LCMV), febra hemoragică argentiniană (virusul Junin) datorită fragilităţii capilarelor, urmată de şocul ireversibil, dar şi alte sindroame descrise ulterior.

Sângele pacienţilor cu febra de Lassa (sat în Nigeria) este foarte infecţios şi de aceea, manevrarea sa impune precauţii speciale. Virusul febrei de Lassa este foarte virulent, cu o rată a mortalităţii de 15%.

Arenavirusurile produc frecvent *infecţii persistente*, ale căror mecanisme moleculare nu se cunosc. S-ar putea datora producerii particulelor virale defective, dar virionii defectivi se găsesc atât la tulpinile care produc infecţii acute, cât şi la cele care produc infecţii persistente.

O trăsătură particulară a celulelor infectate persistent este *relativa absenţă a Ag virale* expuse pe suprafaţă, chiar dacă în citoplasmă ele sunt abundente. Celulele infectate persistent sunt rezistente la suprainfecţia cu un virus omolog, dar sunt permisive pentru infecţia cu arenavirusuri heterologe.

Arenavirusurile, *in vivo,* au spectru de gazdă foarte limitat (*Cricetidae* – leming, *Muridae*), dar experimental se pot infecta şi alte organisme.

Cu excepţia LCMV, toate celelalte sunt denumite după aria geografică în care au fost izolate. Unele arenavirusuri (tulpinile Junin, Machupo şi Lassa) produc infecţii hemoragice severe la om, proporţionale ca intensitate cu titrul virusului infectant. Virusul persistă la purtători, datorită *variaţiei antigenice*, care permite evitarea RI.

Arenavirusurile sunt foarte plastice în privinţa capacităţii de a genera, prin procese mutaţionale, noi variante genetice (quasispecii) şi de a se adapta unor gazde noi, ilustrând concludent conceptul 'emergenţei virale'. Modficările mediului, provocate de popularea unor teritorii virgine, au tulburat echilibrul natural, ducând la apariţia unor noi maladii infecţioase, neaşteptate, care constituie riscuri importante de sănătate publică. Spectrul patologiei determinate de aceste virusuri este foarte larg.

Diagnosticul infecţiei cu arenavirusuri este serologic şi se bazează pe evidenţierea creşterii titrului de circa 4 ori a IgM specific sau prin izolarea virusului. Probele clinice suspectate de prezenţa virusului impun măsuri suplimentare de securitate. De aceea, testele pentru evidenţierea Ac sunt mult mai larg folosite, deoarece Ag virale (inactivate) pentru reacţiile serologice se prepară uşor. *In vitro*, ECP se evidenţiază greu şi de aceea culturile inoculate se examinează prin metoda IF sau imunoperoxidazei pentru detectarea Ag virale. Variatele tulpini de virusuri se diferenţiază utilizând AMC specifici faţă de epitopii care nu se exprimă în serul policlonal.

Răspunsul imun. LCMV este exemplul clasic de virus care induce leziuni determinate de activarea RI. Inocularea imediat după naştere duce la o stare de purtător pentru toată viaţa, fără leziuni. Puii sunt imaturi imunologic şi Ag virale stimulează RI. Inocularea intracerebrală la şoarecele adult produce o coriomeningită letală, fără leziuni neuronale. Imunosupresia prin timectomie neonatală sau prin ser anti-limfocitar (SAL) protejează faţă de efectul letal al infecţiei cu LCMV. Rowe (1954) a demonstrat că patogenia infecţiei cu LCMV nu depinde numai de ECP viral, ci este de natură imunitară.

La om, marea majoritate a infecţiilor cu LCMV sunt inaparente. Pentru infecţiile clinice, incubarea este de 6–13 zile şi pot fi influenza- like (cu febră, frisoane, dureri musculare şi bronşită), ca o meningită aseptică sau ca o meningo-encefalomielită. Forma meningeală este mai comună. In faza acută, un număr mare de celule mononucleare trec în LCR. Presiunea LCR creşte datorită creşterii concentraţiei proteinelor.

Uneori meningita progresează la forma severă a infecţiei, meningo-encefalomielita.

Celulele infectate cu LCMV sunt lizate de limfocitele Tc, iar recunoaşterea Ag necesită ca celulele infectate să prezinte Ag virale asociate cu moleculele CMH.

În al II-lea rând, experienţele au evidenţiat că stabilirea şi menţinerea infecţiei cronice este dependentă de factori ai gazdei şi de factori virali.

Prezenţa complexelor Ag-Ac la animalele infectate persistent a demonstrat că toleranţa celulelor B nu este implicată. Anticorpii se sintetizează faţă de toate proteinele majore structurale ale virusului. Se formează complexe Ag-Ac ce pot fi evidenţiate prin legarea C1q. Totuşi, serul şoarecilor infectaţi cu LCMV este negativ pentru testul fixării C, deoarece Ac nu persistă în ser, ci se leagă pe suprafaţa celulelor infectate, dar nu mediază liza dependentă de C.

LCMV se multiplică în limfocite, care constituie o sursă continuă de virus, dar şi în celulele SFM (macrofage peritoneale şi tisulare).

Infecţia cu un virus al familiei nu conferă protecţie humorală sau celulară, faţă de alte arenavirusuri. Şoarecii infectaţi persistent cu LCMV sintetizează anticorpi faţă de toate proteinele structurale majore. Anticorpii cu reacţie încrucişată pot conferi un grad de protecţie în unele cazuri.

Bibliografie

Bishop D. H. L. 1990. *Arenaviridae* and Their Replication, în vol. Virology, Second Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. et al., Raven Press, Ltd., New York.

Howard C. R. 2004. *Arenaviruses* – în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

21.11. Familia Coronaviridae

Familia cuprinde virusuri mari (80–120 nm), învelite, cu genom ARN mc de polaritate pozitivă, care determină în primul rând, infecţii la om şi animalele domestice: infecţii respiratorii la om, gastroenterita la porc, la câine, la feline, hepatita murină etc. Unele virusuri infecţioase pentru animale (TGEV– virusul gastroenteritei porcine transmisibile, coronavirusul bovin – BcoV, virusul bronşitei infecţioase aviare – IBV) au importanţă veterinară. Denumirea vine de la morfologia particulară a virionilor pe preparatele colorate negativ: peplomere mari, numeroase, sub forma spiculelor glicoproteice proeminente din înveliş, aşa încât formează o coroană (fig. 406).

Virionii sunt înveliţi, de formă sferică (120–160 nm în diametru), cu genom ARN monocatenar unitar de polaritate pozitivă. Este cel mai mare genom dintre toate ribovirusurile (27–30 kb). ARN genomic pur este infecţios. La om coronavirusurile produc răceala comună, iar în 2003 un coronavirus nou a produs epidemia SARS (*s*indromul *a*cut *r*espirator *s*ever).

Familia cuprinde 2 genuri: *Coronavirus* şi *Torovirus*.

Structura. Genomul ARN, cel mai mare genom riboviral (30 kb), este asociat cu proteina N (o fosfoproteină bazică) şi formează o *nucleocapsidă*, lungă, flexibilă, cu *simetrie helicală*, acoperită de un *înveliş lipoproteic* derivat din cisternele Golgi şi mai rar din reg. Invelişul este format din dublul strat fosfolipidic în care sunt inclavate 2 sau 3 tipuri de glicoproteine:

– *S* (spike), o glicoproteină de tip I ce formează peplomerele suprafeţei şi pe imaginile electrono-optice dau aspectul de coroană;

– proteina *M* (membrane) traversează peplosul de 3 ori şi expune un domeniu extern N-terminal scurt;

– proteina *E*, foarte hidrofobă.

Unele coronavirusuri au o proteină suplimentară – HE (hemaglutinin-esterază).

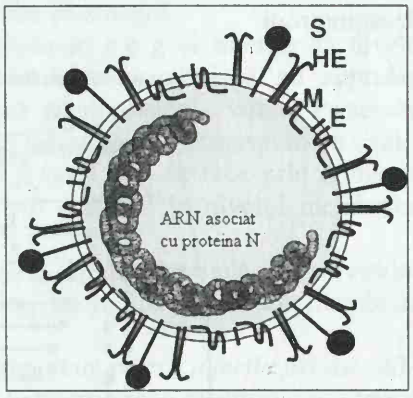


Fig. 406. Reprezentarea schematică a structurii moleculare a unui coronavirus. Virionul este format dintr-o nucleocapsidă alcătuită din ARN şi proteina N (o fosfoproteină), acoperită de peplosul în care sunt inclavate glicoproteinele virale. Spiculele S sunt glicoproteinele cele mai proeminente pe suprafaţa virionului şi conferă virionilor aspectul caracteristic de coroană. Proteina M este transmembranară, foarte hidrofobă şi are 3 domenii care traversează peplosul. Proteina E este o componentă minoră a peplosului. Unele coronavirusuri prezintă o proteină suplimentară, HE (hemaglutinin-esterază) (după Weiss, 2005).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Glicoproteina M este cea mai abundentă, fiind inclusă profund în înveliş, astfel că la suprafaţa învelişului este expusă numai regiunea N-terminală, glicozilată. Poate fi O-glicozilată sau N-glicozilată. Nu este transportată la nivelul membranei, ca majoritatea glicoproteinelor virale, ci se acumulează în cisternele Golgi, ceea ce explică înmugurirea coronavirusurilor la acest nivel.

Proteina S formează spiculii proeminenţi pe suprafaţa virionului. După sinteza în cisternele reg, proteina S este inserată atât în membranele reg, cât şi în membrana plasmatică şi are mai multe roluri: mediază legarea virionului de receptorul celular; induce fuziunea celulară; poate induce fuziunea învelişului viral cu membrana celulei; induce sinteza Ac neutralizanţi; stimulează IMC.

Un coronavirus poate avea multe variante antigenice (serotipuri). Organismul imunizat faţă de un serotip rămâne sensibil la infecţia cu celelalte serotipuri ale aceluiaşi coronavirus. Numărul mare de serotipuri este rezultatul frecvenţei înalte a recombinării, dar şi al evenimentelor mutaţionale.

In vitro, coronavirusurile au o perioadă de latenţă de 6 ore. Se multiplică în celulele speciei de origine sau ale speciilor foarte apropiate.

Majoritatea coronavirusurilor infectează o specie sau câteva înrudite şi multiplicarea este de obicei limitată la celulele epiteliale ale tractului respirator sau intestinal şi în macrofage. De aceea, izolarea este dificilă şi necesită culturi de celule diferenţiate: trahee de fetus uman sau celule ale mucoasei nazale.

In vivo, coronavirusurile au un tropism marcat pentru *celulele epiteliale* ale tractului respirator şi digestiv. Spre deosebire de majoritatea virusurilor învelite, coronavirusurile se multiplică în tractul intestinal. Ele produc infecţii uşoare sau inaparente la organismele adulte, iar la nou-născut, diaree severă.

La om, coronavirusurile produc 15–20% din infecţiile tractului respirator superior (răceala comună) şi sunt implicate în pneumonie şi miocardită. 50% din infecţiile care produc răceala comună sunt produse de rinovirusuri, iar restul de 30%, de adenovirusuri, parainfluenza RSV, influenza.

Coronavirusurile pot determina o infecţie *citocidă* sau *persistentă*, în funcţie de virus şi de celulă. Uneori celulele fuzionează, formând sinciţii, după care se lizează.

Multiplicarea. Virionii se fixează pe receptorii celulelor sensibile prin intermediul spiculelor S. Proteina S îşi schimbă conformaţia şi mediază fuziunea peplosului cu membrana celulei, eliberând nucleocapsida în citoplasmă. Fuziunea nu este singura cale de pătrundere a coronavirusurilor. Pentru unele (SARS-CoV) s-a demonstrat existenţa căii endosomale, sensibilă la acţiunea agenţilor lizosomotropi.

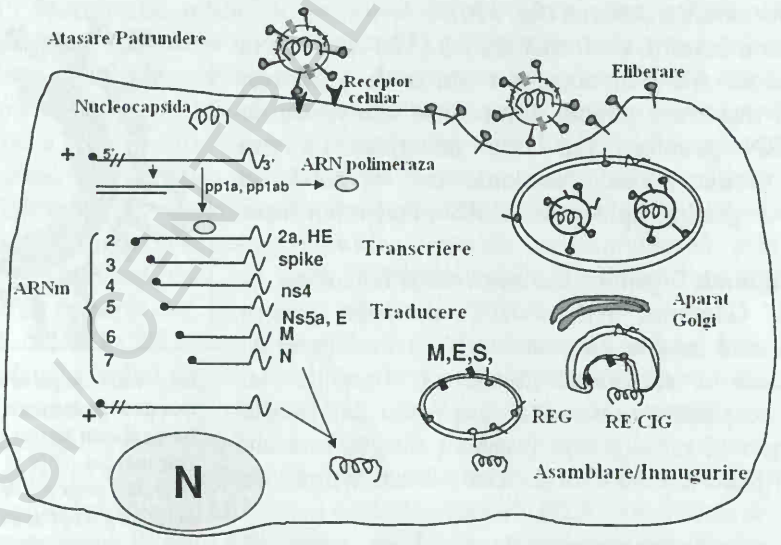


Fig. 407. Ilustrarea schematică a ciclului de multiplicare a coronavirusurilor. Virionul se leagă la receptorii celulari specifici prin intermediul spiculelor glicoproteinei S. Proteinele S îşi schimbă conformaţia şi mediază fuziunea peplosului cu membrana citoplasmatică, eliberând nucleocapsida în celulă. Cadrele de citire (ORF = open reading frame) 1a şi 1b de la capătul 5' al ARN sunt traduse în polipeptidele 1a şi 1ab. Polipeptidul 1ab este tradus prin mecanismul schimbării cadrului de citire, fenomen care se produce cu o frecvenţă de 25–30%. După prelucrarea proteolitică, din cele 2 polipeptide rezultă complexul ARN-polimerazei. Replicarea genomului are loc pe matriţa de polaritate negativă, de lungimea genomului. Proteinele virale sunt traduse din ARNm individuali subgenomici, ale căror secvenţe 3' sunt suprapuse. Fiecare ARNm are o secvenţă leader comună la capătul 5', de 75–78 nucleotide, derivate de la capătul 5' al ARN genomic. Proteinele M şi E se localizează în membranele Golgi, situsul probabil al înmuguririi după Weiss, 2005).

Receptorul de virus este *aminopeptidaza N*, o glicoproteină de suprafață exprimată abundent pe suprafața apicală a celulelor epiteliale ale tractului respirator şi digestiv, ale tubilor renali şi la nivelul sinapselor. Este o protează ce leagă Zn şi catalizează clivarea resturilor N-terminale din peptide. Ea completează degradarea peptidelor scurte în intestin şi inactivează neurotransmițătorii sinaptici în creier. Unele coronavirusuri umane folosesc ca receptori, moleculele CMH I.

ARN genomic, de polaritate pozitivă se asociază cu ribosomii. Expresia genomului începe cu traducerea a 2 poliproteine (1a şi 1ab). După prelucrarea proteolitică co-translațională se formează complexul ARN-pol dependentă de ARN. ARN-polimeraza are rolul de a transcrie catena genomică într-o catenă complementară, rezultând forma de replicare, dublu catenară.

Catena antigenomică a formei de replicare are rol de matriță pentru sinteza replicativă a noilor catene şi pentru transcrierea a 5–7 tipuri de ARNm cu dimensiuni subgenomice, de diferite lungimi. Suma lungimilor ARNm depăşeşte cu mult lungimea genomului. Câteva dintre moleculele de ARNm sunt mult mai mari decât ARNm al celulelor eucariote. Mesagerii formează un set de molecule parțial suprapuse, deoarece capetele 3' sunt comune. Fiecare ARNm conține toată secvența de nucleotide a ARNm inferior ca mărime, plus o genă suplimentară la capătul 5'.

La ARN genomic şi la toate variantele de ARNm, boneta m7G este ataşată de o secvență leader de 60–70 baze, la capătul 5'.

Replicarea şi transcrierea ARN, inițiate cu o secvență leader, explică frecvența înaltă a recombinărilor, neobişnuită pentru un virus ARN cu genom unitar.

Coronavirusurile au o frecvență înaltă a mutațiilor. La fiecare rund de replicare, ARN-polimeraza introduce una sau mai multe mutații, cu o frecvență mare a mutațiilor de deleție. Recombinarea se produce cu o frecvență mare, neobişnuită pentru un genom unitar, în timpul replicării ARN în infecțiile mixte.

Sinteza proteinelor, fiecare codificată de un mesager, contrastează cu ceea ce există la alte virusuri cu catenă de polaritate pozitivă (*Picorna, Toga*), al căror ARNm este tradus într-o poliproteină, clivată ulterior în proteine structurale şi NS. La coronavirusuri, fiecare proteină este codificată de un ARNm propriu.

Asamblarea. Nucleocapsida este helicală, flexibilă, fragilă, greu de izolat şi se asamblează în citoplasmă, prin interacțiunea ARN genomic cu moleculele proteinei N. Proteina N are situsuri de legare specifice cu nucleotidele, dar şi activitate de legare nespecifică față de ARN genomic. Proteina S este distribuită atât în membranele intracelulare, cât şi în membrana plasmatică

Virionii se asamblează prin înmugurire, inițial în membranele r e g şi ulterior la nivelul cisternelor Golgi. La situsul de înmugurire, şiruri de nucleocapside se aliniază pe suprafața citoplasmatică a acestor membrane, în zonele în care s-au inserat glicoproteinele virale. Proteinele celulare sunt excluse din siutusul la care are loc înmugurirea şi sunt înlocuite cu glicoproteinele virale.

Interacțiunea primară a nucleocapsidei cu membrana r e g sau Golgi se face prin domeniul citoplasmatic al glicoproteinei S. Deşi cantități mari de M se pot acumula la nivelul membranei plasmatice, virionii nu înmuguresc la acest situs.

Virionii pot fi eliberați prin liza celulei, dar şi din celula vie. De la cisternele Golgi, virionii sunt transportați în vezicule de r e n, până la periferia celulei, unde fuzionează cu membrana plasmatică şi eliberează virionii în spațiul extracelular.

Capacitatea lor de a se elibera din celula vie este un factor important pentru *infecția persistentă.*

Caracteristic, pe membrana plasmatică a celulei infectate, la microscopul electronic se observă un număr mare de virioni, dar nu înmuguresc din membrană, ci se adsorb pe membrană după ce s-au eliberat. Antigenele virale stimulează RI.

Patogeneza. Coronavirusurile au specificitate pentru specia gazdă, spectrul de gazdă fiind foarte îngust. Cele care infectează animalele au tropism pentru celulele epiteliale ale tractului respirator sau gastro-intestinal. La om, coronavirusurile infectează epiteliul tractului respirator superior.

Epidemia SARS a fost o zoonoză asociată cu infecții grave ale tractului respirator, inclusiv cu pneumonie la om. Virusul se transmite prin aerosoli, dar suprafețele contaminate, excreta şi alte secreții pot să transmită virusul. Nu toți cei infectați transmit virusul.

Receptorul pentru SARS-CoV este ACE_2 (angiotensin converting enzyme 2), o metaloprotează cu Zn. Se consideră că virusul a trecut de la civetă (*Civettictis civetta civetta*) şi a dobândit capacitatea de a infecta omul. Epidemia a început în sudul Chinei (provincia Guandong), unde se face un comerț intens cu animale ținute în captivitate. Perioada de incubație pentru SARS este

de 2–14 zile (o medie de 6 zile). SARS-CoV a fost bine adaptat să recunoască receptorul ACE-2 şi transmiterea interumană a fost foarte eficientă.

Modelul ipotetic al patogenezei SARS-CoV ar parcurge 3 faze: etapa multiplicării virale, a hiper-reactivității imunitare şi etapa distrugerii alveolelor pulmonare. Țesutul pulmonar este infiltrat cu celule gigante multinucleate rezultate din fuziunea macrofagelor. Celulele epiteliului alveolar formează sincitii, o trăsătură a multor coronavirusuri. Virusul se multiplică în celulele sincițiale, care se lizează, reducând suprafața respiratorie.

SARS-CoV produce în primul rând o pneumonie severă, pentru că virusul infectează țintele principale: pneumocitele de tip 1 şi 2. Cele de tip 2 sunt importante pentru repararea leziunilor pulmonare, dar infecția acestor celule blochează răspunsul regenerativ al plămânului şi agravează dificultățile respiratorii. Infecția celulelor alveolare, macrofagelor şi celulelor dendritice interstițiale nu induce sinteza IFN tip 1.

Patogeneza SARS-CoV este specifică. Infecția cu SARS-CoV induce o hiper-reactivitate a sistemului imunitar înnăscut, sub acțiunea *citokinelor* eliberate de macrofage. *In vitro*, macrofagele infectate cu SARS-CoV se activează, inițiază ciclul multiplicării virale dar nu eliberează virus progen (infecție abortivă). La pacienții SARS s-a raportat multiplicarea virusului în celulele mononucleate din sânge. Macrofagele şi CD infectate se activează şi răspund prin secreția crescută a chemokinelor, detectabile în serul pacienților SARS, atractante pentru macrofage, ceea ce explică *infiltratul pulmonar* masiv cu aceste celule. Patogeneza SARS-CoV pare a fi datorată, în primul rând, unui *răspuns inflamator amplu*, activat de citokine şi nu unui răspuns imun specific față de antigenele virale. Patologia pneumoniei produsă de SARS-CoV este un exemplu de răspuns imun înnăscut, scăpat de sub control şi amplificat de citokinele eliberate de macrofage şi CD. Infecția este asociată cu limfopenia.

Diareea este o manifestare frecventă (30–40%) a pacienților, deoarece virusul se multiplică în enterocite, cu tulburări minime ale arhitecturii mucoasei. SARS este o maladie sistemică, cu manifestări nespecifice (mialgie, tulburări digestive). Virusul se multiplică în plămân, dar şi extrapulmonar şi se izolează din țesutul pulmonar, din secrețiile tractului respirator, scaun, urină şi chiar din sudoare.

Diagnostic. Coronavirusurile se izolează în celulele liniei Vero (fibroblaste renale de maimuță verde africană) şi multiplică în culturi de țesut traheal uman sau în CDU (celule diploide umane). Izolarea virusurilor *în vitro* nu este o practică obişnuită. Metodele folosite curent sunt cele de serodiagnostic (RFC, IF, EIA). Metoda sensibilă şi specifică de diagnostic este real time PCR pentru detectarea ARN viral în probele din tractul respirator, scaun, ser, urină. Aspiratul endotraheal are încărcătura virală cea mai mare. In primele 5 zile de boală, încărcătura virală este mică şi rezultatul PCR poate fi negativ. ARN viral rămâne detectabil în secrețiile respiratorii şi în scaun mai multe săptămâni după declanşarea bolii.

Bibliografie

Holmes K. V. 1990. *Coronaviridae* and Their Replication, în vol. Virology, Second Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Weiss S. R., Navas-Martin S. 2005. *Coronavirus* Pathogenesis and the Emerging Pathogen severe Acute Respiratory *Coronavirus*. MMBR, 69, 4, pp. 635–664.

Norkin L. 1995. Virus Receptors : Implications for Pathogenesis and Design of Antiviral Agents. Clin. Micr. Reviews. 8, 2, p. 293–315.

Peiris J. S. M., Poon L. L. M. 2008. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

21.12. Familia Reoviridae

Denumirea derivă de la *r*espiratory *e*nteric *o*rphan, pentru că nici o maladie nu era asociată cu virusul specific. Clasificarea unui virus ca membru al familiei *Reoviridae* se bazează pe prezența unui genom ARN segmentat, dublu catenar (dc), precum şi pe unele caracteristici structurale şi de strategie a multiplicării.

Familia cuprinde 6 g: *Reovirus, Rotavirus* şi *Orbivirus*, infecțioase pentru o varietate de vertebrate şi pentru om. *Colorado tick fever virus*, clasificat anterior ca orbivirus, a fost denumit *Coltivirus*. Alte 3 genuri (*Cypovirus, Fijivirus, Phytoreovirus)* infectează numai insectele şi plantele.

Fiecare gen se deosebeşte de celelalte printr-un număr de proprietăţi fizico-chimice şi structurale: reovirusurile şi orbivirusurile conţin câte 10 segmente genomice, rotavirusurile au 11, iar *Coltivirus* are 12 segmente. Segmentele au lungime variată, între 680 şi 3900 nucleotide perechi.

Denumirile de gen reflectă aranjamente diferite ale subunităţilor proteice.

Rotavirusurile au o capsidă externă netedă, asemănătoare unei roţi, iar spiculele radiază din capsida internă.

La *Orbivirus* (orbis = inel), capsomerele capsidei interne au aspect de inel.

g. *Reovirus* mamalian este prototipul familiei şi are următoarele caractere: este nud, capsida este dublă, simetrie icozaedrică, conţine ARN-polimerază, genomul alcătuit din 10 segmente de ARN dc, este rezistent la solvenţii lipidici, iar în ciclul de multiplicare în citoplasmă nu se dezveleşte complet. S-au izolat 3 serotipuri de *Reovirus* infecţioase pentru om şi peste 77 variante de reovirusuri aviare. Cele aviare produc fuziunea celulelor, nu au activitate HA şi nu se multiplică în liniile celulare mamaliene.

Structura. Capsida externă este icozaedrică şi este formată din 92 (sau 180) capsomere hexa- şi pentagonale, fiecare fiind formată din 3 subunităţi. In alcătuirea capsidei externe intră 3 proteine: σ1, σ3 şi μ1C. Proteina λ2 proemină pe înveliş, deşi are origine internă. La cele 12 vârfuri ale icozaedrului proemină câte un spicul format din 5 subunităţi ale proteinei λ2, originar în regiunea internă. HA (delta 1) este asociată spiculelor şi are rol de fixare a virionului pe suprafaţa celulei.

Capsida internă are simetrie *icozaedrică* şi pare să conţină 122 capsomere, mai mici decât ale capsidei externe şi acoperă genomul.

Proteinele majore ale regiunii centrale sunt λ1, λ2 şi σ2, la care se adaugă 2 proteine minore (λ3 şi μ2).

ARN dc. Celulele infectate cu reovirusuri se colorează uniform cu acridin-oranj, ceea ce a dus la concluzia că ARN este dc (molecula de colorant se inseră în moleculele dc de acizi nucleici). Concluzia a fost confirmată prin centrifugare în gradient de densitate în sucroză. Este singura apariţie a ARN dc în natură. Moleculele nu hibridează una cu alta, sunt transcrise în molecule de ARNm specifice, iar la capătul 5' au secvenţe identice. Cele 10 segmente de ARN dc se observă prin EF în gel de PAA: 3 segmente mari, 3 medii şi 4 mici. Cele 2 catene ale fiecărui segment genomic sunt complementare.

Reovirusurile infecţioase pentru păsări şi mamifere conţin oligonucleotide de ARN, grupate în 3 clase de mărime:

- cele cu 2–20 *resturi de A* (circa 850 copii/virion) sunt mono-, di- sau tri-fosforilate la capătul 5' şi probabil sunt sintetizate în stadiile finale ale morfogenezei virale sub acţiunea catalitică a unei transcriptaze virale;
- oligonucleotide cu G la capătul 5' (2000 copii/virion), lungi de 2–9 nucleotide;
- oligonucleotide scurte alcătuite din 2–8 baze (circa 350 copii/virion).

Funcţia oligonucleotidelor din regiunea centrală a virionului este necunoscută. După infecţie sunt eliberate în celulă şi sunt metilate. Virionii care nu au oligonucleotide sunt infecţioase, ceea ce denotă că ele nu sunt necesare pentru infecţia productivă.

Studiile biochimice au evidenţiat 3 clase de proteine:

- segmentele genomice mari codifică 3 proteine mari (λ) componente ale regiunii centrale;
- segmentele medii codifică 2 proteine structurale şi una NS;
- cele 4 segmente mici codifică 3 proteine structurale şi 2 NS.

Multiplicarea. In vivo, reovirusurile au tropism şi se *multiplică* în *enterocitele* de la vârful vililor intestinului subţire, iar *in vitro*, în celulele de rinichi de maimuţă. Iniţierea infecţiei celulelor renale necesită adăugarea proteazelor la mediul de creştere a celulelor, care activează infecţiozitatea prin clivarea proteinelor capsomerei externe. Multiplicarea este citoplasmatică.

Adsorbţia se face în 15–60 min., între 4–37°. Adsorbţia la 4° permite sincronizarea infecţiei, dar pătrunderea în celulă are loc numai la temperatura fiziologică. Receptorul de virus al enterocitului este *glicoforina A*.

Penetrarea se face după modelul EMR. Virionii, individual sau în grup, în vacuole de fagocitoză, sunt transportaţi prin intermediul citoscheletului, spre centrul celulei, unde fuzionează cu lizosomii.

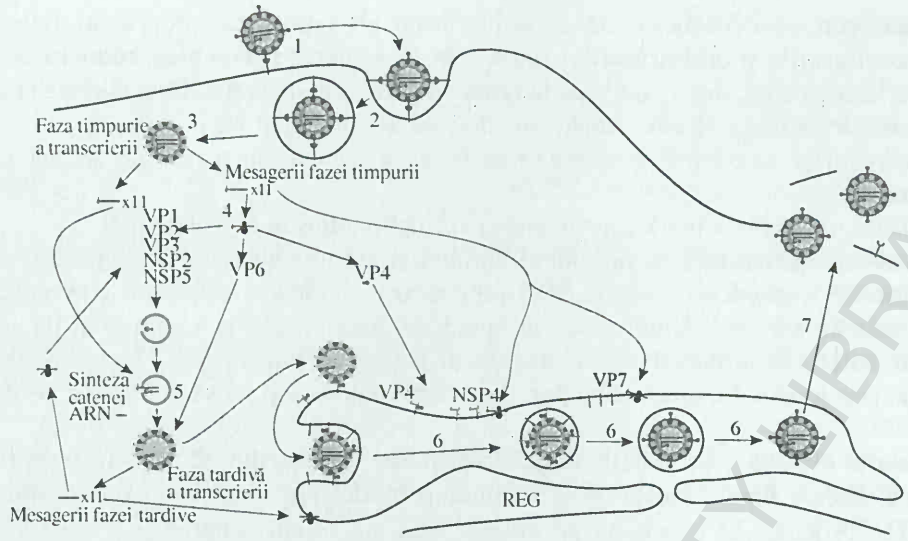


Fig. 408. Reprezentarea schematică a ciclului de multiplicare a reovirusurilor (după Carter şi colab, 2007).

Reovirusurile se transmit pe cale orală şi sunt prelucrate de proteazele digestive în lumenul intestinal. Digestia proteolitică nu inactivează virusul, ci remodelează capsida externă. Virusul este activat, după eliberarea proteinei majore δ3, clivajul proteinei μ1c şi a HA δ1. Virusul prelucrat proteolitic aderă de celulele M. Dezvelirea implică digestia proteolitică a capsidei externe. Rezultă particule subvirale, identice cu cele obţinute *in vitro* sub acţiunea chimotripsinei.

ARN-polimeraza virionică este inactivă, dar se activează *in vitro*, prin încălzire, prin digestie parţială cu chimotripsină sau cu un agent chelator. Se pare că enzima "activată" nu se modifică, ci matriţa ei (catena negativă) se eliberează din constrângerile structurale. Enzima este stabilă termic, cu un optim de activitate la 47–52° şi necesită un cation bivalent cu rol de cofactor. Transcrierea la reovirusuri este *conservativă* şi necesită ATP. Numai *catena de sens negativ* a ARN are rol de matriţă şi se sintetizează catene de polaritate pozitivă, de lungimea genomului. Catena de sens negativ, în timpul transcrierii rămâne asociată cu catena de sens pozitiv. ARN dc rămâne în regiunea centrală a virionului, iar copiile complete părăsesc capsida parţial dezagregată.

ARN dc se sintetizează numai în particulele virale nascente subvirale. In celulele infectate nu se găseşte ARN dc şi nici ARN mc de polaritate negativă.

ARN mc de polaritate pozitivă funcţionează ca ARNm. O parte a moleculelor de ARN mc se asociază cu ARN-pol şi cu precapsida şi au rol de matriţe pentru sinteza catenelor complementare cu care vor constitui ARN genomic dc.

În celula infectată predomină sinteza proteinelor virale pentru că este tradus preferenţial ARNm viral *nebonetat*, probabil prin modificarea dependenţei de bonetare a aparatului de sinteză proteică sub acţiunea unei proteine virale.

Asamblarea. ARN mc şi ARN-pol se asociază cu proteinele capsidei externe şi formează precapsida. ARN mc este convertit la ARN dc. După sinteza dublei catene, se asamblează capsida externă. Treapta finală a morfogenezei implică sinteza oligonucleotidelor. Virionii se eliberează prin liză.

ECP. În celula infectată se formează incluzii denumite "fabrici de virus" sau corpi de incluzie în care se găsesc ARN dc, proteine virale, virioni incompleţi şi completi. Lipsesc ribosomii, ceea ce impune ca ARNm să părăsească "fabrica de virus" pentru a fi tradus, iar proteinele nou sintetizate să fie reorientate spre "fabrică" pentru a fi asamblate în virioni. Microtubulii celulei au rol esenţial în tranzitul moleculelor.

În celulă, sinteza macromoleculelor este inhibată. Marginaţia şi condensarea cromatinei în blocuri heterocromatice semnifică inhibiţia sintezei ADN celular şi blocarea transcrierii.

Mecanismele care asigură asamblarea complementului genomic nu se cunosc. Segmentele genomice par a fi asociate prin interacţiuni necovalente, dar în co-infecţiile cu virusuri diferite ale aceluiaşi subgrup rezultă virioni cu genom reasortat, având segmente de la ambele tulpini virale parentale.

Infecţia persistentă. Infecţia tipică cu reovirusuri este cea *litică*, dar într-o varietate de sisteme celulare *in vitro*, se produc şi infecţii persistente: în fibroblastele embrionare umane, linia fibroblastică

L de şoarece, în celulele ovariene de hamster chinezesc. Infecţia persistentă este favorizată de preparatele virale obţinute prin pasaje la multiplicitate înaltă de infecţie, care conţin particule virale defective interferente, mutante prin deleţie (deleţia segmentului 4) şi mutante *ts*.

Reovirusurile sunt ubicvitare, au spectru larg de gazdă, dar nu sunt cunoscute ca agenţi patogeni pentru om. La adulţii tineri, serul conţine anticorpi specifici, a căror sinteză este indusă de infecţii inaparente.

Rotavirusurile sunt foarte bine adaptate gazdei: se multiplică eficient, au numeroase gazde animale, iar răspunsul imun nu sterilizează procesul infecţios. Infectează enterocitele şi produc diaree la copiii mai mici de 5 ani, la viţei, purcei, miei, păsări etc. Virionii sunt sferici cu diametrul de 75 nm, simetrie icozaedrică, cu structuri asemănătoare cu spiţele unei roţi, dar pe preparatele criomicroscopice (metoda care permite observarea spiculelor), diametrul virionilor este de 100 nm. Aspectul de 'roată' la ME este definitoriu.

Structura. Virionul este o particulă triplu stratificată, deoarece capsida are 3 straturi de capsomere, fiecare strat fiind alcătuit dintr-o proteină distinctă. Proteinele structurale formează un strat intern (alcătuit din VP_2), unul intermediar (format din VP_6, cea mai abundentă şi cea mai antigenică proteină virală) şi unul extern (capsida externă), alcătuit din 780 de copii ale glicoproteinei VP_7 şi 60 de spicule formate din trimeri de VP_4. VP_7 este o proteină glicozilată, neobişnuită pentru un virion nud. Glicozilarea sa are loc în cisternele reg, înainte de a fi încorporată în virion. VP_4 formează spicule la suprafaţă. Ambele proteine (VP_4 şi VP_7) stimulează sinteza Ac neutralizanţi. Efectul neutralizant se produce atât *in vivo* cât şi *in vitro*.

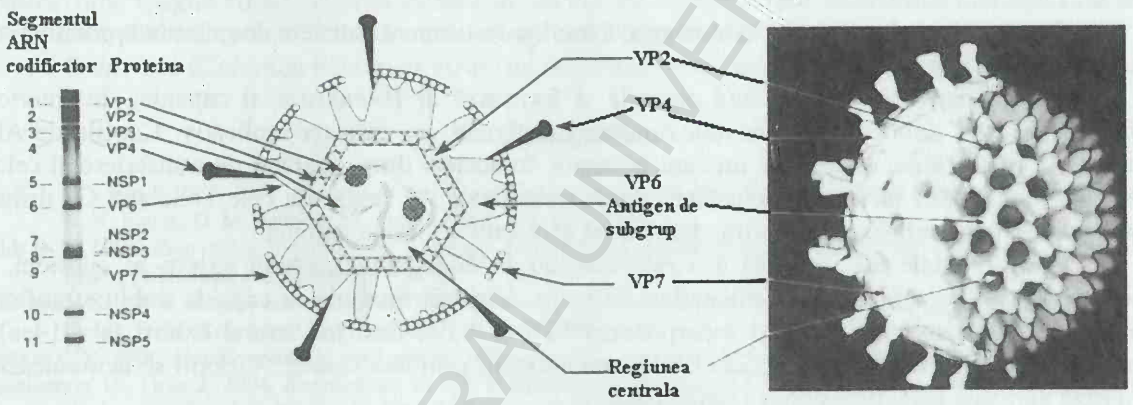


Fig. 409. Profilul ARN în gel de poliacrilamidă cu SDS 10%, proteinele codificate şi structura unui rotavirus (după Desselberger şi colab., 2004). Amănunte în text.

Straturile extern şi intermediar sunt străbătute de canale, care permit transferul compuşilor din citoplasmă spre interiorul capsidei şi exportul copiilor de ARN în timpul multiplicării. În stratul mijlociu, capsomerele sunt aşezate radiar, ca spiţele unei roţi şi constituie componentul major al virionului.

În regiunea centrală sunt localizate alte 2 proteine structurale: VP_1 (ARN polimeraza) şi VP_3, dar şi genomul viral.

În funcţie de specificitatea antigenică a proteinei VP6, rotavirusurile s-au clasificat în 7 grupe serologice (A – G). Rotavirusurile au o restricţie importantă a spectrului de gazdă: omul este infectat de grupele A, B, C. Cele de grup A sunt cei mai frecvenţi agenţi patogeni umani. În zonele temperate, infecţiile sunt mai frecvente în lunile reci.

Genomul este alcătuit din 11 segmente de ARN dc (asociate cu nucleoproteinele VP_1 şi VP_3), ce codifică 6 proteine structurale (VP1, 2, 3, 4, 6, 7) şi 6 proteine NS (NSP1-NSP6). Enumerarea proteinelor se face în ordinea dimensiunilor. Fiecare segment conţine un singur ORF, cu excepţia segmentelor 9 şi 11, care sunt citite în câte 2 ORF.

Rotavirusurile sunt variabile din punct de vedere antigenic. Variabilitatea se produce prin rata înaltă mutaţiilor punctiforme, prin reasortarea segmentelor genomice, care are o frecvenţă crescută în cazul infecţiilor mixte cu 2 sau mai multe variante antigenice şi prin recombinare, un fenomen mult mai rar, dar probabil important în evoluţia pe termen lung (Angel şi Franco, 2005).

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Multiplicare. Virusul se transmite prin ciclul fecal-oral. Rotavirusurile se fixează la vârful microvililor şi infectează *enterocitele*. Particulele triplu stratificate se ataşează prin VP4 la receptorii celulari (glicolipide cu acid sialic sau uneori galactoza) şi pătrund prin mecanismul EMR. Câteva integrine au rol de co-receptori. Clivarea proteinei spicul VP_4 în VP_8 şi VP_5 sub acţiunea tripsinei intestinale uşurează pătrunderea virusului în celulă. VP_8, VP_5 şi glicoproteina VP_7 interacţionază cu integrine ale enterocitelor. Multiplicarea este citoplasmatică.

Odată cu intrarea în celulă, sub acţiunea enzimelor lizosomale, membrana endosomului se permeabilizează, stratul extern al capsidei este dezagregat, iar particula acoperită de straturile mijlociu şi intern trece în citoplasmă şi este activată transcrierea. Fiecare dintre cele 11 segmente genomice este asociată cu o moleculă de ARN-pol (VP_1), care catalizează sinteza unei copii de ARN de polaritate pozitivă pe matriţa de polaritate negativă. VP_3 catalizează bonetarea capătului 5' al noilor catene de ARN în faza timpurie a transcrierii, care vor avea rol de mesageri. Nucleotidele pentru sinteza noilor molecule de ARN (fără secvenţa poli-A) intră în particula virală prin canalele straturilor proteice, iar catenele ies prin aceleaşi canale, trec în citoplasmă şi sunt traduse în proteine. In acest timp, ARN dc al virionului infecţios rămâne intact. Această modalitate de replicare se numeşte *conservativă*.

Proteinele virale se acumulează în citoplasmă, în zone discrete (viroplasmă), unde se asamblează regiunea centrală a virionului din VP_1, VP_2 şi VP_3. Catenele noi de ARN de polaritate pozitivă se asociază cu proteinele regiunii centrale. Un mecanism riguros de selecţie face ca fiecare regiune centrală să se asocieze cu câte un singur segment din cele 11 tipuri ce formează complementul genomic. Mecanismul funcţionează la toate virusurile cu genom segmentat şi constă în recunoaşterea unei secvenţe unice în fiecare segment.

Sinteza catenelor de polaritate negativă are loc în timp ce catenele de polaritate pozitivă sunt încorporate în regiunea centrală.

VP_6 se asociază cu regiunea centrală şi formează al II-lea strat al capsidei. In interiorul particulei cu strat dublu are loc un nou rund de transcriere, cu caracter replicativ. Copiile de ARN rezultate în transcrierea replicativă nu sunt bonetate. In acelaşi timp, aparatul de transcriere al celulei este modificat, astfel încât sunt selectate copiile nebonetate, în raport cu cele bonetate. Ca urmare, sinteza proteinelor celulare este oprită, dar sinteza proteinelor virale continuă.

Stadiile finale ale asamblării virale constau în adăugarea stratului extern al capsidei, cu spiculele VP_4 şi proteina VP_7, N-glicozilată în r e g. Virionii imaturi, cu capsida dublu stratificată, înmuguresc din cisternele r e g şi încorporează VP7 şi VP4, formând stratul extern (al III-lea) al capsidei. Virionii infecţioşi cu capsidă triplă sunt eliberaţi prin liza celulei. Virionii se acumulează şi formează agregate pseudocristaline (viroplasmă).

In vitro se multiplică în culturile secundare de rinichi de maimuţă şi în liniile imortalizate de rinichi, în prezenţa tripsinei.

Epidemiologie. Rotavirusurile sunt foarte contagioase şi infecţiile se produc cu o frecvenţă egală atât în ţările dezvoltate, cât şi în cele emergente, ceea ce denotă că măsurile de igienă nu sunt eficiente pentru controlul infecţiilor.

Patogeneza. Rotavirusurile irită sistemul nervos enteric şi induc diaree secretorie şi creşterea motilităţii intestinale. Necroza extensivă a epiteliului intestinal duce la atrofia vililor, reducerea absorbţiei şi la creşterea presiunii osmotice în lumenul intestinal, producând diareea. Urmează o hiperplazie reactivă a celulelor criptelor, însoţită de creşterea secreţiei de fluid, care contribuie la severitatea diareii.

NSP4 pare să aibă rol de *enterotoxină,* care induce secreţia celulară înainte de apariţia leziunilor histologice, rezultatul fiind diareea datorată malabsorbţiei Na^+ şi glucozei, pentru că celulele lezate sunt înlocuite cu celule imature neabsorbante ale criptelor. NSP4 secretată din celulele infectate, se leagă de un receptor celular şi induce efecte toxice, în afara procesului infecţios, producând creşterea concentraţiei de Ca^{2+} intracelular şi perturbarea echilibrului celular. Anticorpii anti-NSP4 diminuează severitatea bolii diareice la şoarecii sugari.

Deshidratarea, pierderea electroliţilor şi acidoza pot fi fatale la copiii cu vârsta între 6 luni şi 2 ani. Infecţiile medii durează 3–8 zile şi recuperarea este completă. Eliminarea virusului continuă, după dispariţia manifestărilor clinice, încă câteva zeci de zile. Contacţii adulţi se infectează şi sintetizează anticorpi specifici (seroconversie), dar rareori fac simptomele infecţiei. Virusul se detectează rareori în scaun. Reinfecţiile sunt comune, iar după infecţia primară creşte frecvenţa infecţiilor inaparente.

Sursa de infecție este contactul cu copiii mici infectați. Boala epidemică severă se manifestă și în comunitățile închise de persoane vârstnice. Omul este singurul izvor natural de infecție pentru rotavirusurile patogene pentru copii. Contaminarea este de 100% până la vârsta școlară, dar starea de purtător și reinfecțiile sunt posibile chiar în condițiile unei reactivități iumunitare optime.

Nivelul sIgA se corelează cu rezistența la infecție. Celulele Tc răspund specific la Ag virale, dar rolul lor în stoparea infecției sau în protecția față de infecție nu este cunoscut.

Diagnosticul infecției cu un rotavirus presupune evidențierea virusului în scaun în stadiul timpuriu al maladiei diareice, prin metoda aglutinării particulelor de latex sau ELISA și a creșterii titrului anticorpilor serici.

Vaccinul atenuat s-a obținut din rotavirusuri bovine și simiene. Protecția față de infecție este modestă, dar protecția față de diareea severă cu deshidratare este semnificativă (70–80%).

Rotavirusurile se cultivă, cu condiția ca preparatul viral să se trateze cu *tripsină*, iar tripsina să se adauge în cantitate mică în mediul de creștere a celulelor. Tripsina clivează o proteină a capsidei și ușurează procesul dezvelirii.

Tratamentul infecției urmărește restabilirea echilibrului hidroelectrolitic, prin administrarea intravenoasă sau orală a soluției de săruri și glucoză.

Pentru că virusul se transmite pe calea fecal-orală, tratarea apei uzate și instituirea condițiilor sanitare sunt importante pentru controlul infecției.

Orbivirusurile infectează, în mod obișnuit, insectele. De la insecte, unele sunt transmise la vertebrate. Se cunosc peste 100 serotipuri, dar nu au semnificație clinică pentru om. Virusul limbii albastre (blue tongue virus) denumit astfel datorită culorii albastru intens a limbii animalelor infectate, are importanță veterinară: infectează ovinele, caprinele, cornutele și rumegătoarele sălbatice.

Coltivirus (Colorado tick fever virus- un arbovirus) este transmis de căpușe și infectează omul.

Bibliografie

Schiff L. A ., Fields B. N. 1991. *Reoviruses* and Their Replication, în vol. Fundamental Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Fields B. N. 1996. *Reoviridae*, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.

Estes Mary K. 1991. *Rotaviruses* and Their Replication, în vol. Fundamental Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Wickner R. B. 1996. *Double-stranded RNA viruses of Saccharomyces cerevisiae* Microbiol. Rev. 60(1): 250–265.

Desselberger U., Gray J. 2004. *Rotaviruses*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Carter J. B., Saunders V. A. 2007. Virology: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Ltd.

Angel J., Franco M. A. 2008. *Rotaviruses*, în vol. Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology, editors Mahy Brian W. J., Regenmortel Marc H. V. Academic Press.

21.13. Familia Adenoviridae

Denumirea de "adenovirusuri" își are originea în faptul ca reprezentanții grupului s-au izolat inițial, din culturile de tonsile amigdaliene și din cele nazofaringiene ce formează inelul lui Waldeyer (Rowe, 1953).

Adenovirusurile sunt nude, de formă sferică, cu diametrul de 65-80 nm. Capsida are simetrie icozaedrică și este alcătuită din 252 capsomere: 240 de formă hexagonală (hexoni) și 12 de formă pentagonală (pentoni), așezate câte una la fiecare din cele 12 vârfuri ale icozaedrului. La fiecare vârf pentonic proemină câte o structură filamentoasă, denumită *fibră*, cu lungimi diferite de la un serotip la altul. Hexonii și pentonii sunt formați din proteine diferite.

Virionii conțin ADN (13%) și proteine (87%). Nu conțin lipide și sunt rezistenți (stabili) la eter sau etanol.

Virionii conțin cel puțin 12 tipuri de proteine structurale distincte (fig. 410). Ele intră în alcătuirea hexonilor (proteina II), a bazei pentonilor (proteina III), a fibrei pentonilor (proteina IV), proteina asociată bazei pentonilor (III a), proteine asociate hexonilor (VI, VIII, IX), proteine asociate ADN (V, VII, proteina de 55 kDa) și proteine asociate nanomerilor hexonici (X, XI, XII).

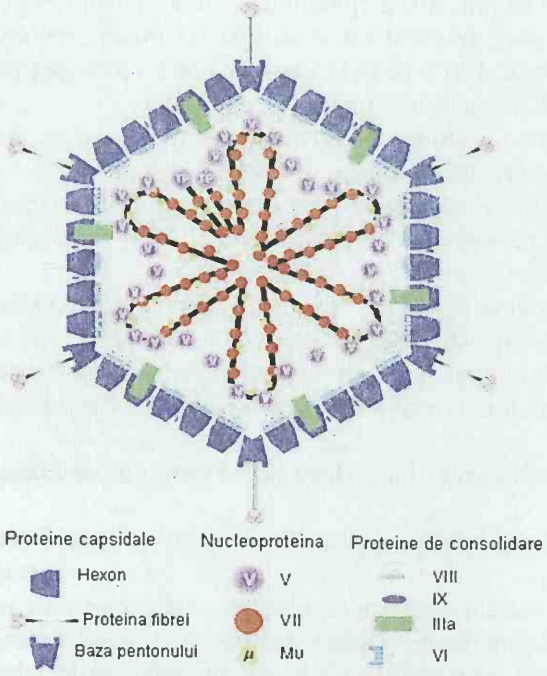


Fig. 410. Reprezentarea diagramatică a localizării proteinelor structurale ale unui adenovirus pe baza analizei virionului prin metoda crio-electron-microscopiei (după K. N. Leppard, 2008).

La electroforeză, după disocierea virionilor cu SDS (sodium dodecil sulfat), un detergent ionic puternic, s-au identificat 11–15 proteine.

Genomul adenovirusurilor este o moleculă de ADN dublu catenară, lineară şi prezintă particularitatea asocierii unui polipeptid de 55 kDa legat covalent de dCMP, la fiecare capăt 5' al genomului linear. ADN are repetiţii terminale inversate, lungi de 100–140 perechi de baze, diferite de la un serotip la altul.

Capsomerele *hexonice* sunt *trimere*, fiind alcătuite din trei molecule proteice identice, asociate prin interacţiuni necovalente. Cele 240 de capsomere hexagonale, conţin 720 molecule identice. In asociaţie cu hexonii sunt alte trei tipuri de polipeptide (VI, VIII, IX).

Capsomerele *pentonice* sunt formaţi din *5 monomeri identici* ai proteinei III, ce formează *baza,* iar *fibra* legată de penton, este alcătuită din alte trei molecule proteice identice (proteina IV).

Adenovirusurile umane sunt distribuite în 52 serotipuri distincte, ordonate în 6 subgrupe diferite (A–F). Clasificarea se bazează pe diferenţe serologice, biochimice şi particularităţi funcţionale. În subgrupe, serotipurile se diferenţiază prin reactivitatea celor 2 proteine majore: hexoni şi fibre.

În fiecare subgrup, omologia ADN este mai mare de 80%. Cele care produc enterită aparţin subgrupului F, serotipurile 40 şi 41.

Adenovirusurile sunt foarte diferite din punct de vedere *antigenic*. Toate serotipurile de adenovirusuri au un *antigen de grup comun*, cu reactivitate încrucişată, situat pe suprafaţa internă a capsomerelor hexonice (proteinele asociate hexonilor).

Serotipurile se caracterizează prin capacitatea lor de a induce sinteza anticorpilor neutralizanţi specifici. Un serotip poate fi definit ca o variantă antigenică dacă este neutralizată de un antiser heterolog, decât cel mult până la diluţia de 1/16. Proteinele care conferă specificitate serologică pentru cele 51 de tipuri antigenice, sunt cele ce intră în alcătuirea *hexonilor* (proteina II) şi proteina constitutivă a *fibrelor* (IV).

Adenovirusurile codifică sinteza unor proteine nestructurale, adică proteine care nu intră în alcătuirea virionilor, dar sunt detectabile în celula infectată.

Proteinele asociate ADN (V, VII, proteina de 55 kDa) sunt bazice şi au rolul de a neutraliza grupările acide ale ADN, uşurând procesul de împachetare. Au conţinut ridicat de arginină, ca şi histonele celulare, dar spre deosebire de acestea nu conţin triptofan.

Familia a fost divizată în 4 genuri:

- *Mastadenovirus* (mastos, lb. greacă = sân), cu 9 grupe infecţioase pentru mamifere (grupul bovin, canin, caprin, equin, uman, murin, ovin, porcin, simian). Cele peste 50 de serotipuri infecţioase pentru om sunt distribuite în 6 grupe: A, B (B1, B2), C, D, E, F;
- *Aviadenovirus*, cu 5 grupe infecţioase pentru păsări: raţă, găină, gâscă, fazan, curcă;
- *Atadenovirus* (denumirea derivă de la conţinutul înalt de A–T al genomului), izolate de la reptile, păsări, marsupiale şi rumegătoare;
- *Siadenovirus* (Si = sialidază), datorită prezenţei în genomul lor a unei gene presupusă a fi omologă genei sialidazei, infectează amfibienii şi păsările.

Ciclul de multiplicare

In vivo, adenovirusurile se multiplică în celulele epiteliale, iar *in vitro*, în celulele liniilor HeLa sau KB. Pentru sincronizarea ciclului de multiplicare, substratul celular se infectează la multiplicitate

foarte înaltă. Ciclul de multiplicare parcurge faze *timpurii şi tardive*, demarcate de momentul începerii replicării genomului viral. Distincţia dintre cele două faze nu este netă, deoarece unele tipuri de ARNm timpuriu se sintetizează şi în fazele tardive.

Adenovirusurile produc 3 tipuri de infecţii: infecţia litică, infecţia latentă/persistentă, infecţia malignizantă. În infecţia latentă, virusul rămâne în celulele limfoide.

Transformarea malignă a celulelor de embrion de şoarece, *in vitro* este indusă de câteva tipuri serologice (12, 18, 31).

Ciclul litic al multiplicării virale durează 32–36 ore. În acest interval, celula infectată îşi *dublează conţinutul de ADN şi proteine*. Creşterea este aproape în întregime datorată sintezei macromoleculelor virale. În stadiile tardive ale multiplicării, proteinele se sintetizează în mare exces şi formează *incluziuni nucleare* cu structură de tip cristalin.

Virionul se ataşează de receptorul celular – CAR (coxsackie adenovirus receptor) din suprafamilia Ig, prin intermediul *fibrei pentonice*. Anticorpii specifici anti-fibră, neutralizează infecţiozitatea virală. Acelaşi efect îl au anticorpii anti-hexoni peripentonali (baza pentonului se află în ambianţa a 5 hexoni). Virionul pătrunde în celulă prin *viropexie* (endocitoză mediată de receptori). Molecule din suprafamilia Ig au rol de receptori, iar integrinele sunt co-receptori. In vezicula de endocitoză, pH scade la 5,5. După ruperea ei, în circa 5 minute, virionul este eliberat în citoplasmă. Capsomerele pentonice (şi fibrele ataşate lor) se desprind din structura capsidei.

Virusul este transportat în citoplasmă, prin sistemul *microtubulilor*. Colchicina, deşi interferă cu asamblarea microtubulilor, nu inhibă multiplicarea virusului, dar *vinblastina* o stopează. Sub acţiunea vinblastinei, tubulina se agregă în structuri paracristaline perinucleare şi astfel particulele virale nu sunt transportate la sediul nuclear al dezvelirii şi multiplicării.

Prin sistemul microtubulilor, virionul ajunge la porii nucleari. ADN asociat cu proteinele sale, pătrunde în nucleu. Majoritatea proteinelor virionului rămân în citoplasmă. ADN viral se complexează cu *proteine histonice celulare* şi formează un complex întru-totul asemănător cromatinei nucleare.

Evenimentele *timpurii* sunt cele care preced sinteza replicativă a ADN:

- intrarea celulei în faza S, pentru a crea condiţiile favorabile multiplicării;
- expresia funcţiilor virale ce anihilează acţiunea mecanismelor protectoare ale celulei gazdă;
- sinteza componentelor necesare replicării ADN.

Transcrierea ARNm, timpurie şi *tardivă,* este catalizată de *ARN-polimeraza II celulară*. Transcrierea este inhibată de *α-amanitină*, un inhibitor specific al acestei enzime. ARN-pol II iniţiază transcrierea la 9 promotori ai moleculei genomice, câte unul pentru fiecare dintre cele 8 gene, cu excepţia E_2 care are doi promotori distincţi pentru faza timpurie şi respectiv tardivă a ciclului de multiplicare. In programul timpuriu sunt transcrise 5 unităţi (E_1A, E_1B, E_2, E_3, E_4), iar în programul tardiv, celelalte 4. Dintre cele 8 gene, numai cea care codifică proteina IX este tradusă într-o singură proteină. Copiile celorlalte gene au situsuri multiple de înnădire* şi poliadenilare, fapt care generează mesageri multipli, fiecare cu potenţial distinct de codificare.

* La adenovirusuri s-a descoperit fenomenul prelucrării ARN premesager. ARNm viral este prelucrat prin clivare şi *înnădire alternativă*, catalizate de enzimele celulare, ceea ce face posibil ca aceiaşi secvenţă de baze să aibă rolul de *intron* pentru unele copii de ARNm şi de *exon* pentru altele. S-a descoperit astfel că ARNm al celulelor eucariote, de obicei, nu este colinear cu secvenţele ADN, ci rezultă prin sudarea unor secvenţe codificatoare separate în genomul ADN.

Înnădirea alternativă amplifică potenţialul codificator al genomului adenovirusurilor. Genomul codifică sinteza a peste 50 de polipeptide diferite, dintre care 13 sunt *structurale*, iar restul sunt *nestructurale* şi au roluri multiple: în replicarea ADN, reglator şi în morfogeneza virionilor.

Se sintetizează peste 20 de proteine timpurii, multe dintre ele fiind NS, cu rol în replicarea ADN. Una dintre genele timpurii blochează programul morţii apoptotice a celulei.

Prima unitate de transcriere exprimată în ciclul de multiplicare este E_1A. Transcrierea E_1A catalizată de factorii celulari generează ARNm de 12 şi 13S. Proteinele codificate sunt necesare pentru multiplicarea productivă a virusului. Ele activează genele virale timpurii şi tardive.

Genomul are, în funcţie de tip, 1–2 gene VA (virus associated), transcrise de ARN pol III.

Replicarea ADN este declanşată după sinteza proteinelor timpurii, iar rolul de primer revine proteinei de 55 kDa de la capătul 5' al fiecărei catene (fig. 411).

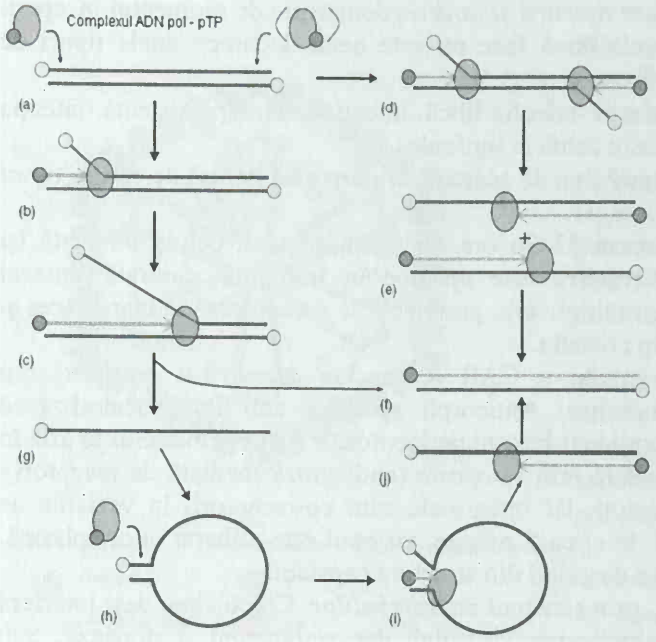


Fig. 411. Modelul general al replicării ADN la adenovirusuri. Linia de nuanță închisă reprezintă ADN parental. Linia de nuanță deschisă semnifică noua catenă de ADN. Săgețile pe catenele noi marchează capătul 3'. Cercurile de nuanță deschisă reprezintă proteina terminală (PT) atașată la capătul 5' al catenei parentale, iar cercurile de nuanță închisă semnifică precursorul proteinei terminale (pPT), cu rol de primer pentru sinteza noilor catene ADN. Ovalul reprezintă ADN-polimeraza. *a.* Complexul ADN-pol-pPT se asociază cu molecula genomică dublu-catenară. *b, c.* O singură catenă genomică este dislocată în direcția 5' – 3', iar catena 3' are rol de matriță pentru catena nouă. *d.* Ambele catene ale moleculei parentale, concomitent, au rol de matrițe pentru sinteza noilor catene. *e.* Cele două catene matrițe, împreună cu catenele nascente se separă. *f.* Sinteza catenei noi este completă. *g, h.* Catena parentală se circularizează prin împerecherea bazelor din secvențele terminale repetate invers. *i.* Catena circulară are rol de matriță pentru sinteza unei catene noi (după K. N. Leppard, 2008).

Evenimentele tardive ale multiplicării încep odată cu replicarea ADN. Expresia genelor L (Late) este controlată de un *promotor*, de unde se inițiază transcrierea unui premesager unitar (29 000 nt), ulterior prelucrat prin clivare și înnădire în cel puțin *18 molecule de ARNm tardiv*, transferate și traduse în citoplasmă.

Genele celulare continuă să fie transcrise în cursul infecției, dar foarte puține copii sunt transportate în citoplasmă. Un complex de proteine virale timpurii (E) inhibă transportul citoplasmatic al mesagerilor celulari, dar favorizează transportul ARNm viral. Se sintetizează în mare exces proteine virale cu rol structural.

Asamblarea virionilor are loc în nucleul celulei gazdă. Proteina hexonică se sintetizează în 3–4 minute și asamblarea, după sinteză, este rapidă. Asamblarea hexonilor este mediată de o proteină de "eșafodaj" (proteina necesară în timpul asamblării unei structuri, dar absentă în produsul final al asamblării).

Polipeptidele pentonice se sintetizează în 1,6 minute și se asamblează după o cinetică bifazică: baza pentonică se asamblează din 5 molecule identice ale proteinei III, iar fibra pentonică, din trei molecule identice ale proteinei IV.

Capsomerele sunt transportate în nucleu. Cele hexonice se asamblează în *capside goale*, procesul fiind asistat de proteine "de eșafodaj". Urmează câteva stadii succesive, în cursul cărora se asociază diferite proteine componente.

ADN nud intră în capsida preformată, pe la unul dintre vârfurile icozaedrului, din care lipsesc pentonii, după ce o secvență ADN cu rol de semnal de împachetare recunoaște capsida. In capsidă, ADN se asociază cu proteinele specifice și se pliază. In etapa finală, proteinele de eșafodaj sunt eliminate și icozaedrul se închide prin adăugarea pentonilor, la care au fost deja ancorate fibrele.

ECP. In vivo, adenovirusurile se multiplică în celulele epiteliale ale tractului respirator, gastro-intestinal, conjunctival și în limfocite.

Pentonii sunt citotoxici, iar proteinele timpurii neutralizează efectul TNF, inhibă apoptoza și expresia moleculelor CMH I și împiedică recunoașterea celulelor infectate de către limfocitele Tc. La microscopul electronic, aspectul structural caracteristic este marginația cromatinei (fig. 412).

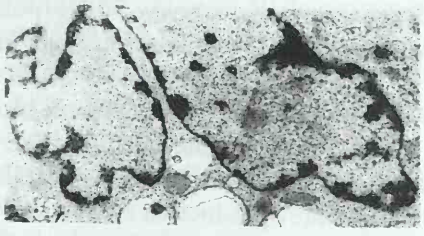


Fig. 412. Fenomenul de marginație a cromatinei, în celulele HEp-2, la 8 ore după infecția cu adenovirusul 3, x 40.000 (original).

Infecția cu adenovirusuri are efecte profunde asupra sintezelor macromoleculare ale celulei. Este inhibată sinteza

ADN şi a proteinelor (fig. 413, 414). Cauza principală a blocării sintezei proteinelor este *oprirea transportului ARNm celular spre citoplasmă*, deşi în nucleu transcrierea ARNm este foarte activă. Inhibiţia sintezei proteinelor celulare este rapidă după infecţie, deşi ARNm celular este stabil.

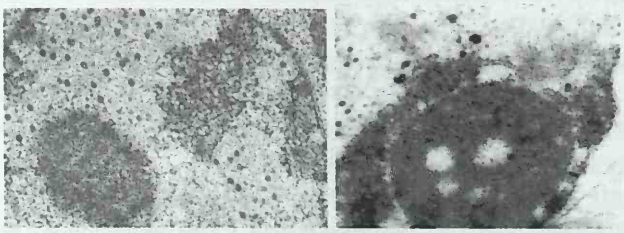


Fig. 413. ECP în celulele HEp-2 infectate cu adenovirusul 3. În stânga, segregarea componentelor nucleolare, granulară şi fibrilară. În dreapta se evidenţiază regiunea organizatoare a nucleolului, x 95.000 (original)

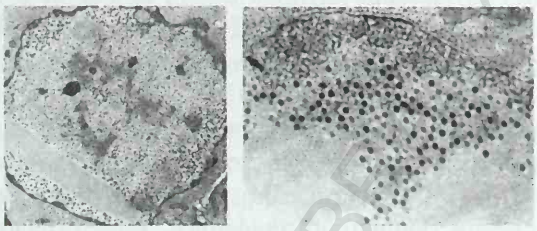


Fig. 414. ECP în celulele HEp-2 infectate cu adenovirus 3. În stânga, componenta granulară fragmentată a nucleolului are aspectul unor mase electronodense diseminate, x 60.000. În dreapta, proteinele virale sintetizate în mare exces formează incluzii nucleare paracristaline, x 150.000 (original).

Efectul multiplicării adenovirusurilor este *liza* celulei gazdă. Virionii progeni se eliberează după moartea şi dezintegrarea celulei. Cele mai multe particule virale progene nu sunt infecţioase. Raportul dintre numărul virionilor şi UFP variază între 11/1 şi 2300/1.

Adenovirusurile produc câteva tipuri de infecţii:

- litice, în special în celulele epiteliale;
- infecţii persistente latente în structurile limfoide ale inelului Waldeyer (tonsile, adenoide) şi ale mucoaselor;
- transformarea malignă, *in vitro*, a celulelor de rozătoare infectate cu serotipuri de grup A, care se integrează în genomul celulei şi stimulează proliferarea celulelor fără producerea virusului progen.

Patogeneză. Adenovirusurile se multiplică în celulele epiteliale ale tractului respirator, gastro-intestinal, ale conjunctivei, vezicii urinare şi în ficat, cu excepţia serotipurilor 40 şi 41. Adenovirusurile produc 1/3 din totalul infecţiilor acute ale tractului respirator, unde infecţia ia forma rinitei sau faringitei, în funcţie de serotipul viral şi de starea pacientului. La copiii mici, infecţia poate evolua la pneumonie cu potenţial letal. De obicei, virusul nu se diseminează dincolo de ganglionii limfatici regionali. Cele mai multe tulpini virale se multiplică în epiteliul intestinal şi de cele mai multe ori, infecţiile sunt subclinice. Adenovirusurile produc circa 5% din totalul infecţiilor respiratorii la copii şi mult mai puţine la adulţi. Infecţiile sunt, de regulă, uşoare şi autolimitate. Uneori produc conjunctivită şi infecţii gastro-intestinale la copiii mai mici de doi ani. La băieţi şi la indivizii imunocompromişi, adenovirusurile produc cistită hemoragică şi virionii apar în urină.

Pacienţii imuno-compromişi suferă infecţii severe cu adenovirusuri. Pacienţii SIDA fac infecţii ale tractului gastro-intestinal. La pacienţii cu transplant, adenovirusurile pot să producă pneumonie cu evoluţie fatală.

Mecanismele latenţei adenovirusurilor nu sunt cunoscute. Unul dintre ele ar fi modularea RI al gazdei. Virusul persistă perioade lungi (ani), se multiplică cu o rată foarte mică şi se eliberează periodic în secreţiile tractului respirator şi salivare.

Răspunsul imun înnăscut mobilizează macrofagele, complementul, celulele NK, sinteza citokinelor proinflamatorii, toate cu rol în eradicarea procesului infecţios. IFN poate induce apoptoza celulelor infectate. Răspunsul imun adaptativ este mediat de celulele TCD_4 şi TCD_8. Celulele TCD_4 recunosc Ag bine conservate la diferitele serotipuri de virusuri şi stimulează proliferarea limfocitelor B şi sinteza Ig.

Virusul evită efectorii RI prin mecanisme multiple:

- virusul codifică molecule de ARN (ARN asociat virusului =VARNA) transcrise de ARN-pol III, cu efect inhibitor al funcţiei PKR;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- inhibă apoptoza mediată de TNF şi Fas. TNF este o citokină proinflamatorie eliberată de macrofage şi de celulele T activate;
- inhibiţia expresiei moleculelor CMH I şi reţinerea lor în reg.

Răspunsul imun constă în activarea celulelor Tc. Ele recunosc peptidele virale prezentate în asociaţie cu moleculele CMH I şi lizează celulele ţintă.

Patologie. Adenovirusurile produc infecţii ale tractului respirator superior: serotipurile 1, 2, 5 (grupul A), iar serotipurile 3, 7 (grupul B) infectează tractul inferior (bronşită, bronşiolită, laringită (crup) şi pneumonie) şi produc, uneori, un sindrom asemănător tabloului clinic pertussis. Probabil că infecţia cu *B. pertussis* creează condiţii favorabile reactivării adenovirusurilor latente.

Adenovirusurile sunt agenţii febrei faringo-conjunctivale (conjunctivită foliculară, faringită), cheratoconjunctivită epidemică, infecţii gastro-intestinale, cistită hemoragică la copii şi la pacienţii imunocompromişi, cu hematurie amplă, creşterea frecvenţei micţiunilor.

Diagnostic. Metoda directă de diagnostic este izolarea virusului pe substrat celular uman de origine epitelială. Cele mai sensibile sunt celulele renale de embrion uman. Liniile celulare stabilizate (HeLa, Hep-2, KB) sunt sensibile, dar culturile sunt menţinute cu dificultate în stare viabilă pentru intervalul lung (28 de zile) necesar multiplicării izolatelor cu ciclul lent. Multiplicarea adenovirusurilor produce *acidifierea* mediului de creştere a celulelor, datorită creşterii ratei glicolizei, cu producerea acidului lactic. Scăderea valorii pH (virajul roşului fenol la culoarea galben citrin) este indicatorul multiplicării adenovirusurilor.

Serotipurile enterice 40 şi 41 se cultivă cu dificultate (se multiplică într-o linie celulară specială – 293).

La examenul microscopic, celulele infectate au nuclei mari, cu o margine subţire de citoplasmă şi incluzii bazofile. *ECP* constă în aglomerarea şi rotunjirea celulelor, cu incluzii intranucleare şi apare după un interval de 2–28 zile în funcţie de cantitatea de virus din inocul, de serotip şi de sensibilitatea celulelor. ECP trebuie confirmat cu AMC specifici, prin metoda IF.

Pentru diagnosticul gastro-enteritei acute, metoda directă de detectare, datorită numărului mare de particule virale (10^6–10^8/ml), este *examenul electrono-optic.* Genomul viral se detectează pe cale directă, prin metode moleculare, cu sau fără amplificare. Hibridarea moleculară se aplică pentru diagnosticul infecţiei pe secţiuni.

Detectarea directă a antigenelor virale se realizează prin testul IF, cu seruri imune specifice anti-proteină histonică în substratul celular infectat. Metoda este rapidă şi se foloseşte pentru identificarea virusurilor infecţioase pentru tractul respirator.

Metoda EIA este utilă pentru diagnosticul infecţiilor virale enterice în probele fecale, în care Ag este extracelular.

Genomul se evidenţiază prin metoda hibridării şi PCR.

Metodele indirecte de diagnostic sunt cele *serologice* şi constau în determinarea titrului IgG şi IgM. Sunt semnificative creşterile de cel puţin 4 ori a titrului lor între valorile din faza acută şi din convalescenţă. Metodele serologice includ fixarea C, ELISA, HAI, IF, neutralizarea.

Metodele serologice au câteva dezavantaje: IgM specific se detectează la 20–50% din totalul infecţiilor; un răspuns serologic slab oferă un rezultat fals negativ; răspunsul anamnestic heterotipic produce un răspuns fals pozitiv; au un caracter retrospectiv.

Infecţia cu un adenovirus induce sinteza anticorpilor specifici faţă de antigenul de grup. Metoda *fixării C* este folosită curent pentru diagnosticarea infecţiei cu orice tulpină de adenovirus. Creşterea de circa 4 ori a titrului anticorpilor, între faza acută şi convalescenţă este indicatorul infecţiei recente.

Epidemiologie. Adenovirusurile se găsesc în populaţia umană a întregului glob. Contaminarea se face în copilărie. Cele mai comune sunt serotipurile respiratorii (1, 2, 3, 5, 7) şi cele gastro-intestinale (40, 41). Adenovirusurile ocupă locul II, după rotavirusuri, ca agenţi ai diareii. De obicei nu produc epidemii explozive.

Adenovirusurile se transmit prin contact direct, prin aerosoli, pe cale fecal-orală, prin apă, instrumente oculare şi lenjerie. Infecţiile oculare pot fi contractate în piscină sau prin instrumentele oculare.

Persistenţa. Adenovirusurile infecţioase pentru om aparţin la peste 50 de serotipuri. Ele pătrund pe cale respiratorie, gastro-intestinală sau conjunctivală. Infecţiile acute sunt limitate la

celulele epiteliale ale tractului respirator, gastro-intestinal şi ochi. Cele mai multe infecţii sunt inaparente şi virusurile persistă luni de zile în organism, producând o infecţie *latentă* în celulele epiteliului intestinal şi în ţesutul limfoid.

Mecanismul latenţei nu se cunoaşte: ADN ar putea fi integrat în cromosomii celulei gazdă sau rămâne fizic independent, iar proteina codificată de regiunea genomică E_3 inhibă citoliza mediată de TNF şi, prin legarea de moleculele CMH I, blochează recunoaşterea epitopilor antigenici de către limfocitele Tc.

Adenovirusurile codifică proteine modulatoare ale răspunsului imun, probabil cu rol important în infecţia persistentă. Virusul se protejează de efectorii răspunsului imun şi persistă la un nivel scăzut pentru perioade lungi, cu eliberarea periodică a virusului infecţios în fecale şi în secreţiile respiratorii. Adenovirusurile 1, 2 şi 5 persistă în tonsile şi chiar în limfocitele circulante de la adulţii sănătoşi, pentru perioade de ordinul anilor, cu multiplicare la un nivel scăzut.

Mecanismele prin care adenovirusurile persistente evită acţiunea efectorilor imunitari sunt mutiple:

- inhibă funcţiile IFN prin intermediul ARN asociat virusului (VARNA) şi a E1A. VARNA este transcris de ARN-pol III a celulei şi începe timpuriu în ciclul infecţios. VARNA se asociază cu PKR şi inhibă efectele induse de IFN;
- inhibă apoptoza mediată de TNF;
- inhibiţia expresiei moleculelor CMH I. Proteinele timpurii ale virusului se asociază cu CMH I în reg şi blochează transportul lor spre membrană.

Animalele de laborator se infectează greu cu adenovirusuri, dar puii şi adulţii tineri de hamster sunt sensibili. Toate adenovirusurile pot să transforme celulele semi- sau nepermisive *in vitro*, dar potenţialul oncogen *in vivo* este foarte limitat: unele tipuri de adenovirusuri umane (12, 18, 31) induc tumori la puii nou născuţi de hamster. Genele transformante aparţin programului timpuriu (E), localizate la capătul stâng al genomului viral. Efectul tumorigen *in vivo* se asociază cu efectul unor gene timpurii de a inhiba sinteza moleculelor CMH I, astfel încât celulele nu pot să prezinte antigenele virale şi scapă detectării limfocitelor Tc. Adenovirusurile nu par să aibă rol semnificativ în dezvoltarea neoplaziilor umane.

Bibliografie

Horwitz M. 1990. *Adenoviruses*, în vol. Virology, Sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Horwitz M. 1990. *Adenoviridae* and Their Replication, în vol. Virology, Sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Martinez-Palomo A. 1968. Ultrastructural Study of the Replication of Human Adenovirus Type 12 in Cultured Cells. Path. Microbiol. 31: 147–164.

Echevaria M. 2009. *Adenoviruses*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology sixth Edition, ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, B.D. Schoub P. D. Griffith P. Mortimer, Wiley Blackwell, John Wiley & Sons, Ltd.

Hierholzer J. C. 1992. *Adenoviruses* in Immunocompromised Host. Clin. Microbiol. Rev. 5, 3, pp. 262–274.

Mihăescu Gr., Mişcalencu D., Ionescu M. D. 1979. Nuclear ultrastructural modifications of the adenovirus 3 infected cells of HEp-2 line. Rev. Roum. Biol., 1979, 24, 1, 23–28.

Mihăescu Gr., Gavrilă L., Mişcalencu D., Ionescu M. D. 1981. Experimental ribosomal gene amplification in thyoacetamide treated HEp-2 cells. Rev. Roum. Biol. 26, 2, 127–132.

Mihăescu Gr., Gavrilă L., Mişcalencu D.1982. Ultrastructural study of *adenovirus* 3 replication in thyoacetamide pretreated HEp-2 cells. Rev. Roum. Biol. 27, 2, 135–140.

Mihăescu Gr., Gavrilă L., Aderca I. 1984. Nuclear material expulsion from HEp-2 line cells during *adenovirus* 3 replication cycle. Rev. Roum. Biol. 29, 2, 138–141.

Mihăescu Gr. 1985. Inhibition of some deoxyriboviruses replication cycle in tannic acid pretreated cells. Rev. Roum. Biol., 1985, 30, 2, 175–179.

Gr. Mihăescu. Macrosegregation of nucleolar components of Hep-2 line cells after tannic acid treatment . Rev. Roum. Biol., 1985, 28, 1, 180–184.

K. N. Leppard . 2008. *Adenoviruses*, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

21.14. Familia Herpesviridae

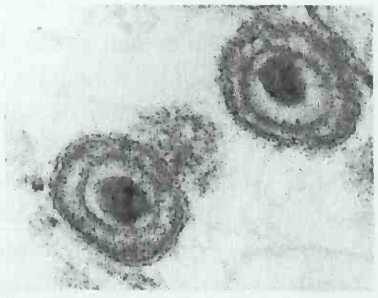


Fig. 415. Imaginea electrono-optică a virionilor HSV-1 în secțiune. Nucleoproteina electrono-densă ocupă zona centrală. Capsida cu contur hexagonal acoperă nucleoproteina. Tegumentul, un compartiment electronoclar, este amorf, iar peplosul are o structură tipic membranară, x 250.000 (original).

Familia *Herpesviridae* reunește peste 100 de virusuri diferite, infecțioase pentru toate clasele de vertebrate, cu importanță medicală considerabilă. Au proprietăți biologice particulare, deoarece produc infecții care rămân *latente* pentru tot restul vieții, dar sunt reactivate *periodic (infecții recurente)*, producând leziuni la sau lângă situsul infecției inițiale. Sunt bine adaptate la gazdele lor, adeseori infecțiile primare sau cele recurente fiind inaparente sau însoțite de manifestări clinice variate: herpesul labial, gingivo-stomatite, keratite, encefalite și malformații congenitale (*Herpes simplex virus – HSV 1*) sau infecții urogenitale (*Herpes simplex virus – HSV 2*). În regiunile temperate, virusul Epstein-Barr produce mononucleoza infecțioasă, iar în regiunile tropicale ale Africii este agentul limfomului Burkitt (tumoră a maxilarului, originară în limfocitele B).

Structura. Virionii au structură unitară, fiind alcătuiți din 4 elemente structurale:

- *regiunea centrală* conține ADN ce pare să se înfășoare de la interior spre exterior, pe un ax proteic central, formând o structură toroidală;
- *capsida proteică*, formată din 162 capsomere (150 hexoni și 12 pentoni), așezate după o simetrie icozaedrică. În alcătuirea capsidei intră *8 tipuri* de proteine. Capsomerele au formă cilindrică și sunt goale la interior. Atât hexonii, cât și pentonii sunt alcătuiți din aceiași proteină;
- *tegumentul amorf*, reprezentat de spațiul dintre înveliș și suprafața capsidei, ce conține cel puțin 20 de componente proteice. Proteina majoră este VP16 și probabil are rol în modularea interacțiunii virus-celulă, deoarece în ciclul infecțios este transportată în nucleu, unde se asociază cu ADN viral. Unele proteine ale tegumentului sunt esențiale pentru multiplicarea virală, altele conferă eficiență multiplicării, iar altele, *in vitro*, nu sunt necesare pentru multiplicare;
- *învelișul extern*, în care se găsesc inclavați spiculii. Învelișul și anexele sale conțin cel puțin 11 glicoproteine, care singure sau în asociație, au diferite roluri: adsorbția virionului, pătrunderea în celulă, diseminare, evitarea acțiunii efectorilor imunitari. Unele dintre ele au specificitate de familie sau de gen.

Toate proteinele structurale ale virionului sunt sintetizate în ciclul infecțios.

S-au descris *trei tipuri* de virioni:

a) virioni fără genom și fără înveliș (capside goale);

b) virioni alcătuiți din capsidă și genom, dar fără înveliș;

c) virioni maturi, ce conțin toate componentele structurale.

Virusurile acestei familii au o morfologie unitară, dar se deosebesc prin proprietățile biologice.

În funcție de spectrul de gazdă, de durata ciclului de multiplicare, de efectele citopatice pe care le produc, herpesvirusurile au fost divizate în trei subfamilii; α, β și γ.

Reprezentanții subfamiliei *Alfaherpesvirinae* au un spectru de gazdă foarte îngust. Ciclul de multiplicare este scurt și litic. Sunt neurotrope și produc infecții latente, în special în ganglionii senzitivi (HSV 1, HSV 2, virusul varicella zoster – VZV).

Subfamilia *Betaherpesvirinae* cuprinde virusuri cu spectru îngust de gazdă, iar ciclul de multiplicare este lung. *In vitro*, frecvent, produc infecții de tip echilibrat, deoarece se multiplică cu o rată scăzută și celulele rămân viabile (virusul citomegalic – CMV, HHV 6 și HHV 7).

Reprezentanții subfamiliei *Gamaherpesvirinae* produc maladii limfoproliferative la gazdele naturale. Sunt specifice pentru limfocitele T sau B, dar ciclul de multiplicare se blochează în mod frecvent și infecția devine latentă (virusul Epstein-Barr). Calificativul de "virusuri limfotrope" nu este adecvat, deoarece limfocitele sunt semipermisive.

Genomul herpesvirusurilor este o moleculă de ADN dublu catenară, lineară, împachetată sub forma unui *toroid*, pe un ax proteic. Capetele moleculei sunt probabil, în strânsă proximitate, deoarece se circularizează rapid după ce genomul ajunge în nucleul celulei infectate. Molecula conține 125–140 kbp și prezintă secvențe repetate în ordine inversată sau directă, la extremități sau la interior, care delimitează secvențe codificatoare unice: *L* (*L*arge) și *S* (*S*mall). Secvențele unice *L* și *S* se pot inversa una față de cealaltă și produc patru *izomeri* lineari, notați cu *P* (Prototip), *IL* (inversia secvenței L), *IS* (inversia secvenței S) și *ISL* (inversia ambelor secvențe).

La unele herpesvirusuri, genomul constă dintr-o secvență unică, flancată de secvențe repetate în ordine directă.

Numărul genelor identificate prin analiza de secvențiere variază între 70 (la HSV 1) și 200 (la CMV). Genele se denumesc cu prefixul segmentului genomic, UL (unique long) sau US (unique short) în care sunt localizate și se numerotează secvențial. Numărul mare de gene asigură desfășurarea ciclului de multiplicare în condițiile variate oferite de substratul celular. Totuși, circa jumătate din genele HSV 1 par a fi neesențiale, deoarece pot fi clivate fără să influențeze multiplicarea virusului *in vitro*.

Virionul conține *poliamine* – spermidina și spermina – (40–70 000 molecule/virion), cu rolul de a neutraliza grupările acide ale ADN, creind astfel condiții favorabile plierii moleculei de ADN în interiorul capsidei. Poliaminele par a fi strâns asociate moleculei de ADN.

Lipidele învelișului viral sunt dobândite în celula gazdă.

Ciclul de multiplicare

După atașare, virionul se leagă la resturile de *heparan-sulfat** ale proteoglicanilor membranari, învelișul *fuzionează* cu membrana plasmatică. *Glicoproteina C se leagă* cu un receptor celular, iar glicoproteinele B, D, H, K și L sunt necesare pentru fuziunea învelișului viral cu membrana celulei (glicoproteine *Hve* = *h*erpes *v*irus *e*ntry).

* Heparan-sulfatul este un proteoglican, o macromoleculă alcătuită dintr-o regiune centrală proteică, pe care se leagă covalent catene laterale de glicozaminoglicani, formând un monomer proteoglicanic. Mai mulți monomeri se leagă prin intermediul componentei proteice, de o moleculă lungă de acid hialuronic. Glicozaminoglicanii (MPZ acide) sunt polizaharide ce conțin unități dizaharidice înalt repetitive.

Nucleocapsida este transportată pe calea microtubulilor până la porii nucleari, la nivelul cărora ADN genomic este eliberat *în nucleu,* unde se circularizează, se asociază cu histonele celulare și este transcris în mesagerii specifici pe toată durata infecției productive. Transcrierea este catalizată de *ARN-polimeraza II celulară*, cu participarea factorilor virali. Cele mai multe virusuri ADN codifică proteinele pe ambele catene și de aceea catenele nu sunt pozitive sau negative. *Mesagerii sunt bonetați, metilați și poliadenilați de enzime codificate de virus.*

Proteinele virale îndeplinesc funcții specifice în ciclul de multiplicare: unele inhibă sinteza macromoleculelor celulare (ADN, ARN, proteine), altele au rol în sinteza ADN viral sau rol reglator.

Complexitatea structurală și genetică a acestor virusuri, impune acțiunea unor mecanisme reglatoare complexe. Genele sunt grupate funcțional, în raport cu momentul transcrierii. Expresia genelor este reglată și ordonată secvențial într-o *cascadă progresivă* de complexitate crescândă: α (IE-immediate early), β (E-early), γ (L-late).

Exprimarea genelor timpurii este necesară pentru expresia celorlalte gene virale:

– în stadiul *imediat timpuriu* al ciclului infecțios sunt exprimate 5 gene (α), în absența sintezei proteice. Transcrierea lor este activată de proteina nucleară α-TIF (*f*actorul de *i*nducere a *t*ranscrierii), care mediază interacția ARN-pol II celulare, cu ADN viral. Expresia genelor IE orientează ciclul de multiplicare spre evoluția litică. Toate codifică factori de transcriere, cu rol în comutarea la transcrierea genelor E și L;

– proteinele codificate de genele α activează genele *β* (programul timpuriu). Multe proteine ale programelor α și β sunt enzime sau proteine asociate ADN. *Genele β* codifică sinteza unui set de 7 enzime implicate în metabolismul acizilor nucleici (ribonucleotid-reductaza, timidin-kinaza, timidilat-sintetaza, DN-aza alcalină) și în replicarea ADN genomic (ADN-polimeraza, helicaza, primaza), care nu par a fi esențiale pentru multiplicarea virală, deoarece celula posedă astfel de enzime.

Timidin-kinaza are un spectru de activitate mai larg decât al enzimei omologe din celulă, deoarece fosforilează nu numai dezoxipirimidinele, ci şi purinele (adenina, guanina) legate de pentoze, precum şi o varietate de *analogi ai nucleozidelor* care nu sunt fosforilaţi eficient de kinazele celulare.

Ribonucleotid-reductaza reduce ribonucleotidele la dezoxiribonucleotide, creind un substrat de rezervă pentru sinteza ADN;

Enzimele nu sunt necesare pentru multiplicarea virusului în celulele care se divid cu o rată crescută, deoarece enzimele celulare suplinesc pe cele virale, dar sunt importante pentru multiplicarea virusului în celulele care nu se divid sau în cele menţinute la temperatură nepermisivă (39,5°).

Rata maximă a sintezei proteinelor β este la 5–7 ore după infecţie. După acumularea unor cantităţi suficiente, începe replicarea ADN.

Replicarea ADN reprezintă un eveniment central în ciclul de multiplicare virală. Rata înaltă a replicării ADN orientează celula, ireversibil spre infecţia productivă, care poate duce la liza celulei.

Herpesvirusurile codifică un număr mare de enzime implicate în sinteza ADN.

Marcajul în puls* arată că moleculelor replicate le lipsesc capetele libere, ceea ce semnifică faptul că ADN se replică prin intermediul unor molecule circulare sau al unor concatemeri lineari în conexiune cap-coadă (vezi capitolul Multiplicarea virusurilor).

Altă dovadă că moleculele noi au dimensiuni mari este adusă de experienţele cu precursori marcaţi: moleculele marcate sedimentează mult mai repede decât moleculele dublu-catenare de dimensiuni obişnuite.

* Principiul metodologic al marcării în puls: proba biologică este incubată în "mediul cald" ce conţine un precursor radioactiv (timidina marcată cu tritiu – H^3), un interval scurt de timp (fracţiuni de secundă), după care este transferată în "mediul rece".

La începutul intervalului de sinteză, în celula infectată se găsesc molecule lineare şi circulare de ADN viral. Cel puţin în faza tardivă a ciclului infecţios, ADN se replică după mecanismul "cercului rotativ" şi se formează concatemeri care sunt clivaţi în molecule de dimensiunea genomului, ce vor fi împachetate în capside.

După replicarea ADN, expresia genelor timpurii este redusă semnificativ sau stopată, dar este activată transcrierea genelor programului tardiv (γ), care codifică *peste 30* de proteine structurale diferite (proteinele capsidei, proteinele asociate ADN).

Proteinele virale se sintetizează pe poliribosomii liberi sau asociaţi reticulului endoplasmic şi sunt prelucrate prin clivare, fosforilare, glicozilare şi sulfatare.

Asamblarea. Glicoproteinele virale sunt sintetizate în cisternele reg şi transportate în cisternele Golgi. Alte proteine structurale se acumulează în nucleu, unde se asamblează precapsidele (fig. 416). Precapsida este mai rotundă decât capsida matură şi se asamblează în jurul proteinei de cofraj. ADN interacţionează cu proteinele specifice, este împachetat în precapsidă pe la un vârf al icozaedrului şi apoi este secţionat din concatemerii genomici. În timpul împachetării ADN, proteinele de eşafodaj sunt îndepărtate de o protează virală. Cele două procese sunt strâns legate. Clivarea se produce la o secvenţă cu rol de semnal de împachetare, la joncţiunea a două copii ale genomului. Nu s-au identificat proteinele cu rol de clivare şi împachetare a genomului.

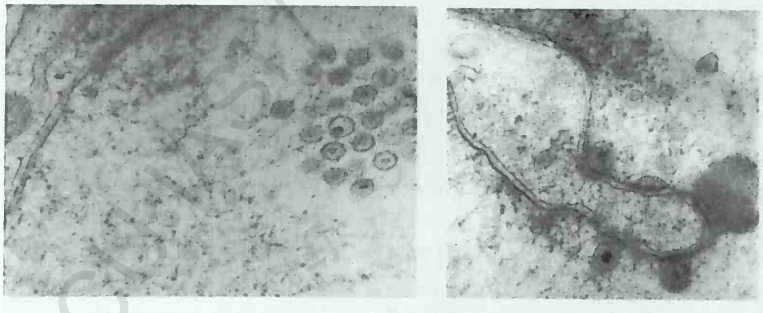


Fig. 416. Nucleocapside de HSV-1 în nucleu (stânga, 96.000). Virionii herpetici se învelesc la contactul cu membrana nucleară internă (dreapta), x 120.000 (original).

Proteinele tegumentului migrează în nucleu şi se concentrează în arii distincte sub membrana nucleară. În fazele târzii ale ciclului infecţios, semnul distinctiv este apariţia *membranelor nucleare*

reduplicate (zone groase, concave sau convexe). Învelişul viral se formează la nivelul acestor zone. Deoarece virionii nu conţin cantităţi detectabile de proteine membranare, este probabil că zonele îngroşate reprezintă agregări de proteine virale, cu următoarea distribuţie: glicoproteinele învelişului glicozilate în cisternele Golgi se localizează pe membrana externă, iar proteinele tegumentului, în membrana internă. Nu se cunoaşte mecanismul încorporării lor în membranele nucleare.

Glicoproteinele virale sunt transportate şi la nivelul membranei plasmatice şi celula infectată devine ţinta răspunsului imun.

Învelirea virionilor are loc la nivelul membranei nucleare (fig. 416). Capsidele virale care au încorporat ADN genomic se ataşează de lamela internă modificată a membranei nucleare şi se învelesc. Cele goale rămân nude, iar cele care conţin ADN mai scurt decât genomul standard sunt reţinute în nucleu. Situsul învelirii este lamela internă a membranei nucleare, unde procesul este foarte rapid. Virionii pierd învelişul la trecerea prin membrana nucleară externă în citoplasmă şi dobândesc învelişul final în veziculele derivate din cisternele Golgi. Învelirea se produce şi în citoplasmă, deoarece se observă capside juxtapuse membranelor plasmatice. Cele mai multe proteine ale tegumentului, sunt dobândite în citoplasmă, iar altele, probabil în nucleu.

Virionii maturi sunt transportaţi în vezicule derivate din reticulul endoplasmic neted, până la contactul cu membrana citoplasmatică, unde fuzionează şi îi eliberează la suprafaţa celulei (fig. 417, 418).

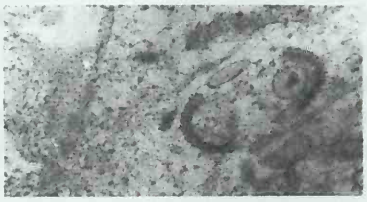


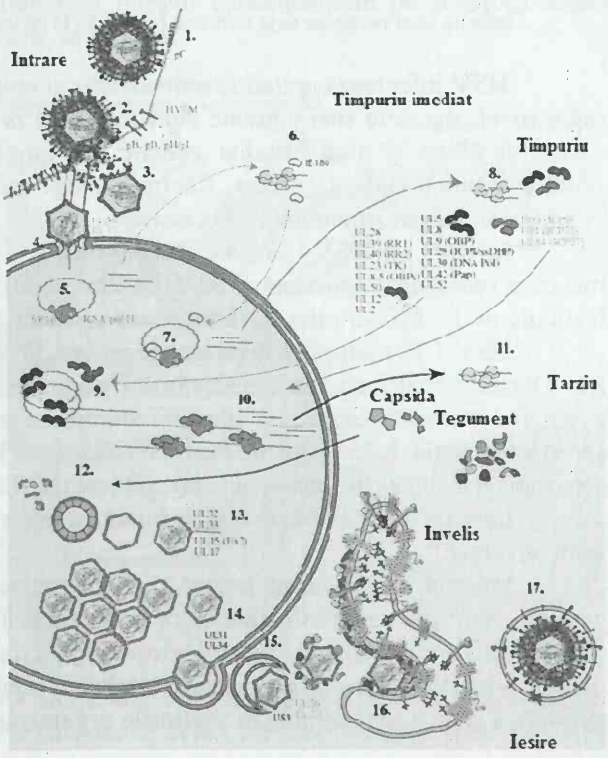
Fig. 417. Învelirea HSV în citoplasmă cu membrane ale cisternelor Golgi, x 120.000 (original).

Fig. 418. În citoplasmă, virionii sunt transportaţi în vezicule derivate din cisternele reticulului endoplasmic (stânga) şi sunt eliberaţi la suprafaţa celulei (dreapta, x 115.000, original).

În celulele permisive, *in vitro*, ciclul multiplicării virale durează 18–20 de ore.

Virionii înveliţi infecţioşi pot rămâne asociaţi cu celula şi se răspândesc în alte celule prin procesul de fuziune mediat de virus sau se eliberează din celulă şi reiau ciclul (fig. 419).

Fig. 419. Ilustrarea schematică a ciclului de multiplicare a unui α-herpesvirus. 1. Virusul se leagă de receptorul suprafeţei celulare (glpr C învelişului cu heparan-sulfatul celular). 2. Treptele ulterioare ale pătrunderii în celulă necesită alte glpr de înveliş (D, B, H, L). 3. După fuziunea peplosului cu membrana celulei, proteinele capsidei şi tegumentului sunt eliberate în celulă. Proteinele tegumentului preiau controlul aparatului celular de sinteză proteică. 4. Capsida şi proteinele tegumentului sunt transportate de către microtubuli, la nucleu. 5. Proteina VP_{16} a tegumentului se localizează în nucleu independent de capsidă şi activează transcrierea proteinei imediat timpurii (IE_{180}), catalizată de ARN-pol II. 6. Proteina IE_{180} este transportată în nucleu. 7. In nucleu, IE_{180} activează transcrierea genelor timpurii. 8. Genele programului timpuriu codifică 2 categorii de proteine: 15 proteine sunt implicate în sinteza ADN. 9. 7 dintre proteinele timpurii sunt esenţiale pentru replicarea ADN viral, prin mecanismul cercului rotativ. 10. A II-a categorie sunt 3 proteine timpurii cu rol de activatori ai transcrierii. 11. Iniţierea sintezei ADN semnifică intrarea în stadiul tardiv al ciclului de multiplicare şi sinteza proteinelor tardive. 12. Proteinele capsidale sunt transportate în nucleu şi se asamblează în jurul unui eşafod (cofraj) proteic. 13. Capsida matură este alcătuită din 5 tipuri de proteine. Una dintre ele acţionează ca situs de intrare a ADN genomic în capsidă. 14. În timpul învelirii primare, nucleocapsida înmugureşte din nucleu şi intră temporar în spaţiul dintre cele două membrane. 15, 16. Nucleocapsida pierde învelişul primar, se asociază cu proteinele tegumentului şi se înveleşte final prin înmugurire în reţeaua transgolgiană. 17. Virionii sunt transportaţi spre suprafaţa celulei, într-o veziculă derivată din compartimentul de învelire (după Pomeranz şi colab., 2005).



ECP. Cele mai timpurii modificări, după infecția productivă, se observă la nivelul nucleolului: se măreşte prin distribuția laxă a componentelor, se deplasează spre membrana nucleară, se dezagregă sau se fragmentează (fig. 420). Cromatina se desprinde din situsurile de inserție pe matrice, nucleul se deformează şi devine polilobat. Celulele se rotunjesc şi devin reciproc aderente, dar unele mutante determină fuziunea celulară şi formarea policariocitelor.

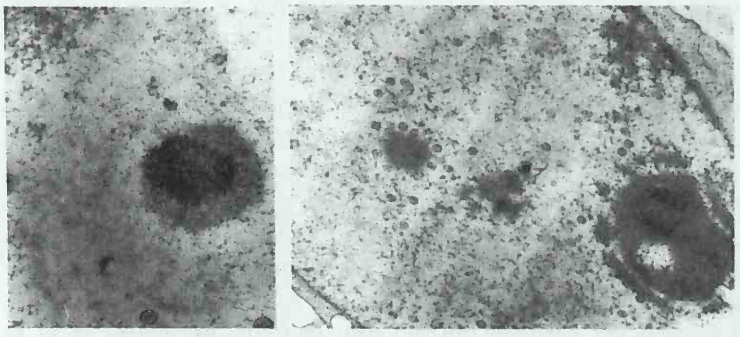


Fig. 420. ECP indus de virusurile herpetice în celulele HEp-2: segregarea (stânga) şi fragmentarea nucleolului (dreapta), x 80000 (original).

Modificările metabolice ale celulei infectate se produc în două etape:

- sub acțiunea proteinelor structurale ale virionului infecțios. Proteina U_{L41} din structura virionului pare să rămână în citoplasmă unde produce *dezagregarea poliribosomilor şi degradarea ARN celular.* Astfel rata sintezei proteinelor scade rapid;
- sub acțiunea proteinelor virale sintetizate *de novo.* Se produce stoparea rapidă a biosintezei macromoleculelor specifice celulei: sinteza ADN şi a ARNr este blocată de proteine ale programului timpuriu.

Celulele infectate cu virusuri herpetice se lizează.

În anumite tipuri celulare, genele IE nu sunt transcrise şi infecția evoluează sub forma latenței. În timpul latenței expresia genelor virale este minimă şi genomul viral nu se replică.

Patogenitate

Infecția *primară** (prima experiență a organismului sensibil cu HSV-1 sau 2) este inițiată prin diseminarea virusului dintr-un proces infecțios activ.

* Infecția unei persoane deja infectată (cu HSV-1) cu un alt tip de virus (HSV-2) este denumită infecție inițială.

HSV infectează *epiteliile mucoaselor* şi *epiteliul tegumentar* lezat. Infecția se poate produce la orice nivel, dar cele mai comune sunt infecțiile *orale* şi *genitale.* HSV-1 şi HSV-2 se transmit prin contactul direct şi sunt înrudite genetic: au omologie extinsă a nucleotidelor şi un grad înalt de omologie funcțională a genelor. Recombinanții stabili se generează uşor în cultură mixtă (dar nu *in vivo*) şi dau reacții imunitare încrucişate.

Infecția cu HSV-1 are loc între 6 luni şi 5 ani de la naştere. HSV-1 infectează predominant mucoasa orală, dar reprezintă şi 30–50% din totalul izolatelor genitale, iar HSV-2 s-a izolat rareori din leziunile orale. *HSV-2* infectează mucoasa genitală, probabil, la începutul vieții sexuale.

HSV-1 se multiplică la poarta de intrare. Perioada de incubație este de 2–12 zile, cu o medie de 4 zile. Durata infecției este de 2–3 săptămâni, cu grade diferite de severitate. Infecția *orală primară* produce o gingivo-stomatită acută, cu ulcerații dureroase ale mucoasei bucale, însoțită frecvent de febră şi adenopatie locală. Infecția nu are fază viremică, fiind limitată la *epiteliul şi la neuronii senzitivi regionali* şi determină o leziune caracteristică la nivelul joncțiunii dintre tegument şi mucoasa labială.

Infecția primară este autolimitată şi se vindecă în 2–3 săptămâni, timp în care are loc seroconversia.

Infecția *tegumentară* rezultă din contaminarea leziunii cu virus din *salivă* sau din *secrețiile genitale.* Sunt frecvente infecțiile celor care practică sporturi de contact: lupte, rugby.

Infecția *oculară* produce *cherato-conjunctivită* uni- sau bilaterală.

Virulența este o proprietate multifactorială care reflectă capacitatea unui virus de a se multiplica şi de a se disemina în țesuturile organismului, în competiție directă cu efectorii RI.

Virulența virusurilor herpetice se evaluează în raport cu capacitatea de a se multiplica și de a produce *encefalită, după inoculare intracerebrală* la maimuță. În infecțiile umane, pe fondul unei reactivități imunitare normale, encefalita este foarte rară. Virusurile herpetice invadează SNC, probabil prin infecția unui nerv cranian.

Tulpinile de virus herpetic diferă prin gradul de virulență și de *neuroinvazivitate*. HSV este transportat în nevrax prin filetele nervilor. Invazia *SNC* este rară și se manifestă ca o *encefalită*, caracterizată prin infecția citolitică, în primul rând a neuronilor din *lobii temporali*. Toate grupele de vârstă au sensibilitate egală la invazia herpetică a SNC. Netratată, encefalita produce mortalitate de peste 70%. După vindecare rămân sechele. Encefalita poate fi, în proporții egale, consecutivă *infecției primare* sau *recurenței*. Nu se cunoaște mecanismul invaziei SNC și nici factorii predispozanți. Mortalitatea este înaltă, iar vindecarea este însoțită de sechele.

Herpesul *neonatal* este produs de HSV-2 (frecvența este de 1/5000). Infecția are loc *in utero*, în timpul sau după naștere. Sursa de infecție este organismul matern, prin contactul fătului în timpul nașterii cu leziunile herpetice ale tractului genital. Nașterea prin cezariană elimină riscul infecției. Herpesul neonatal poate fi dobândit postnatal prin contactul cu persoane care elimină virus. Majoritatea infecțiilor neonatale sunt produse de HSV-2. Infecția neonatală este totdeauna simptomatică și produce 3 tipuri de entități clinice : leziuni localizate la nivelul tegumentului, ochiului și mucoasei bucale; encefalită; infecție generalizată (plămân, ficat, SNC, tegmument, glande suprarenale). Mortalitatea infecției neonatale, netratată, este de 50%.

Dacă virusul vine în contact cu terminațiile nervoase, multiplicarea periferică inițială în celulele epiteliale ale mucoasei nu este necesară. Indiferent de situsul infecției sau de tipul de virus, HSV pătrunde în *terminațiile nervoase senzitive* și este transportat spre pericarion. Nucleocapsidele traversează joncțiunea sinaptică a celulei epiteliale, intră în terminațiile senzitive și sunt transportate prin flux axonal *retrograd*, spre corpii neuronali ai ganglionilor senzitivi regionali: ganglionul *Gasser*, ganglionul *nodos* al vagului și respectiv ganglionii *sacrali*. Transportul este mediat de *microtubuli*. Medicamentele care dezorganizează microtubulii inhibă transportul virusului de la periferie spre neuron.

În neuroni, virusul urmează una dintre cele două modalități de infecție (fig. 421):

- *infecție productivă*, cu eliberarea virusului progen și posibila diseminare în țesutul nervos, consecința fiind *encefalita*;
- *o infecție latentă*, cu transcriere genică limitată, fără producerea virusului matur.

Bazele moleculare ale latenței s-au studiat în infecții experimentale pe șoarece, cobai, iepure. Virusul se inoculează în țesutul plantar, în ochi, în ureche.

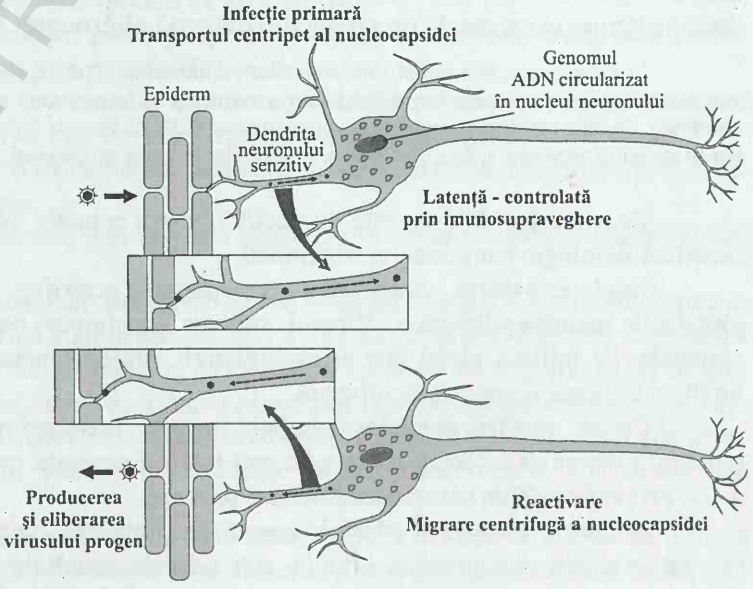


Fig. 421. Alternanța fazei de infecție productivă în celulele epidermei și a celei de latență în neuronii senzitivi. În infecția primară, virusul se atașează și penetrează terminațiile senzitive locale. Nucleocapsidele și proteinele tegu-mentului sunt transportate retrograd prin terminația periferică, de-a lungul microtubulilor până la pericarion, unde virusul persistă sub forma ADN circularizat în stare fizic autonomă (analog plasmidelor). În faza de latență, în și pe celula infectată nu se detectează antigene virale și nu se asamblează virioni progeni. Sistemul imunitar nu recunoaște neuronii infectați latent (modificat, după M. Forsgren și colab., 2009).

Latența. Proprietatea distinctă a virusurilor herpetice este capacitatea de a produce *infecții latente* în neuroni, pentru tot restul vieții. În celulele care nu se divid, nu sunt necesare proteine virale

pentru menținerea latenței. Latența este consecința stopării ciclului de multiplicare. Cascada expresiei genice este stopată, transcrierea fiind limitată la un set restrâns de gene ale programului timpuriu. Sunt transcrise numai copiile LATs (*L*atency *A*ssociated *T*ranscripts), care asigură replicarea limitată a genomului. În neuroni, virusul persistă sub forma *genomului viral în copii multiple cu conformație circulară,* deosebită de conformația lineară în virion. Una dintre proteinele LATs inhibă apoptoza neuronului infectat latent cu HSV-1.

Metoda hibridării *in situ* a evidențiat un număr mic de copii genomice în neuronii ganglionului trigeminal: circa 10% din celulele unui ganglion infectat latent conțin 1–10 molecule genomice, pentru că ADN viral este replicat cu o rată scăzută, prin mecanisme virale și celulare. Nu s-au detectat proteine virale. În perioada latenței, nu se asamblează virus progen, cu excepția unor episoade intermitente. Latența este comparabilă cu faza lizogenică a fagului λ. Replicarea genomului cu o rată scăzută este importantă pentru menținerea latenței și permite reactivarea. Latența virusurilor herpetice este posibilă numai în neuron, deoarece este o celulă nepermisivă. *In vitro*, neuronii ganglionari infectați devin permisivi pentru multiplicarea virusului.

În infecția oro-facială, HSV infectează nervul și ganglionul trigeminal, iar în infecția genitală, HSV infectează nervii și ganglionii lombo-sacrali.

Majoritatea populației adulte este infectată *latent* cu HSV. Majoritatea celor infectați latent nu au memoria infecției primare, dar nici nu suferă leziuni recurente. O minoritate dintre cei infectați latent suferă *recurențe clinice* periodice, cu leziuni veziculare la joncțiunile mucocutanate ale cavității orale și nazale, care ulcerează, fac crustă și se vindecă în 4–7 zile.

Recurența semnifică *reactivarea virusului* latent în ganglioni, stabilirea unui focar în epiteliul oral și eliminarea în salivă. Activarea virusului latent *in vivo,* se produce sub acțiunea mai multor factori: imunosupresia, schimbări hormonale, diferite condiții de stres, expunerea la raze UV, traumatisme, medicamente ce stimulează sinteza PG. Reactivarea și reinocularea virusului în celulele epiteliale necesită ca o precondiție, multiplicarea în neuron. Se presupune că în neuronii infectați latent se produce activarea în cascadă a programului genetic α, β, γ și se asamblează nucleocapside virale, care sunt transportate centrifug prin sistemul microtubulilor până la sinapsa cu celulele epiteliale. Permisivitatea neuronilor *in vivo* este trecătoare: intervalele permisive alternează cu cele nepermisive.

Stimulii produc modificări ale fiziologiei neuronale, favorizând transcrierea genelor virale. La reactivare multiplicarea virusului este strict controlată: glicoproteinele virale nu sunt expuse pe membrana neuronului, iar neuronul ar supraviețui episoadelor de reactivare. Deși ciclul multiplicării în celulele epiteliale este totdeauna litic*, nu există dovada lizei neuronului senzitiv. În neuron, infecția latentă alternează cu cea de tip productiv, datorită alternanței stărilor fiziologice ale celulei.

* La reactivare, în neuroni sunt asamblați puțini virioni, fără expresia glicoproteinelor pe suprafața celulei. Genele virale interferă cu apoptoza și împiedică moartea celulei și astfel neuronul poate să supraviețuiască episoadelor repetate de reactivare. Studiile pe celulele cultivate ale ganglionilor rădăcinii dorsale de la embrionii umani sugerează că ieșirea virusului din terminațiile nervoase se face prin transport vezicular pe calea axoplasmei.

Reactivarea HSV nu este distructivă pentru celulele infectate latent și recurențele repetate nu modifică fiziologia ganglionului trigeminal.

Nucleocapsidele virale sunt transportate centrifug prin prelungirile nervoase până la joncțiunile neuro-epidermice. Virusul străbate joncțiunea neuro-epidermică și infectează celulele epiteliale. Se inițiază ciclul litic al multiplicării virale. Repetarea ciclului litic în celulele învecinate produce leziunea herpetică recidivantă.

Cu cât numărul celulelor epiteliale în care virusul se multiplică inițial este mai mare, cu atât numărul neuronilor infectați latent este mai mare. Frecvența reactivărilor și severitatea leziunilor este direct proporțională cu severitatea infecției primare.

Leziunea recurentă clasică constă în formarea veziculelor pline cu virus, în imediata vecinătate a situsului infecției inițiale, sub celulele epiteliale squamoase cheratinizate. Infecția este litică, iar vezicula conține un infiltrat dens de celule inflamatorii (în special mononucleare).

Probabilitatea recurențelor produse de HSV-1 și HSV-2 scade cu vârsta. Recurențele genitale sunt mai frecvente.

Răspunsul imun la procesul infecțios implică o interacțiune complexă a celulelor NK, macrofagelor, limfocitelor şi a citokinelor asociate. Reacția imună este orientată față de celulele infectate şi față de virionii liberi. În timpul infecției primare, multiplicarea virală este asociată cu reacția inflamatorie nespecifică intensă. Reacția de HSÎ este urmată de răspunsul specific al limfocitelor Tc şi de sinteza anticorpilor. La reactivare, aria leziunii este invadată de celule NK, numeroase TCD_4 care secretă citokinele specifice şi *puține* TCD_8. Răspunsul imun este *modulat* de HSV. Celulele infectate cu HSV sunt rezistente la acțiunea litică a limfocitelor Tc, prin inhibția expresiei moleculelor CMH I şi implicit a peptidelor virale citosolice. Deficiența IMC poate fi asociată cu infecția severă.

Protecția anti-HSV este conferită de celulele TCD_8, şi de citokinele eliberate de setul CD_4Th_1. Celulele TCD_8 controlează mulplicarea HSV în neuroni printr-un mecanism mediat de *citokine* şi nu prin efect litic direct. Limfocitele T specifice recunosc Ag virale asociate cu moleculele CMH şi sunt esențiale pentru stoparea evoluției procesului infecțios. Deficitul funcțional al celulelor T este asociat cu infecții severe şi prelungite.

Serul pacienților ce se vindecă de infecțiile severe cu HSV poate să conțină Ac față de toate proteinele structurale ale virusului, dar sunt specifici în primul rând față de glicoproteinele de înveliş. Anticorpii anti-D sunt neutralizanți. Anticorpii serici nu protejează față de reinfecție, dar severitatea infecțiilor succesive se corelează invers cu titrul Ac. Anticorpii neutralizează virionii, iar complexele imune virion-Ac-C pot să determine creşterea ratei fagocitozei virale. Anticorpii specifici față de alte antigene virale nu sunt protectori, dar pot produce maladia cu CI. De aceea, pentru a fi eficient, un vaccin trebuie să inducă sinteza Ac specifici față de glicoproteinele de înveliş care mediază legarea virionului de receptorii celulari. În infecția primară se sintetizează IgM, IgG, IgA. În timpul recurențelor predomină IgG. Răspunsul imun timpuriu are specificitate de tip antigenic, iar cei tardivi reacționează încrucişat.

Majoritatea adulților (70–90%) sunt seropozitivi şi se crede că poartă virusul latent. Unii fac o singură recurență, iar alții au episoade recurente multiple de intensități variabile, în funcție de reactivitatea IMC. Anticorpii materni sunt transferați pasiv la nou-născut. Între 6–24 luni este perioada sensibilității maxime la infecția cu herpes. Anticorpii transplacentari nu sunt complet protectori, dar limitează amploarea infecției. Titrul anticorpilor anti-HSV-2 creşte după începerea activității sexuale.

*Diagnostic*ul infecției herpetice se bazează pe izolarea virusului din leziunile labiale şi genitale, pe un substrat celular sensibil. Lichidul vezicular este bogat în virus. HSV-1 şi 2 se multiplică repede în culturi fibroblastice şi epiteliale umane şi produce ECP în 1–7 zile. Celulele se rotunjesc, volumul creşte. Tulpinile proaspăt izolate produc rareori fuziuni celulare, iar cele pasate în mod repetat, *in vitro,* produc fuziuni frecvente (policariocite = sincitii).

Microscopia optică cu UV foloseşte anticorpi specifici cuplați cu un fluorocrom, care permit localizarea rapidă şi specifică a virusului prin metoda IF directe sau indirecte.

Fluidul vezicular este bogat în virioni. Examenul lichidului vezicular la *microscopul electronic* prin tehnica colorației negative, este o metodă rapidă pentru detectarea HSV.

În cazurile de encefalită, LCR conține puține particule virale şi ADN se detectează prin PCR. În acest caz virusul se cultivă din biopsie.

Pentru detectarea HSV s-a folosit metoda *hibridării probelor* clinice cu oligonucleotide marcate radioactiv sau cu enzime.

Acizii nucleici de HSV pot fi detectați în biopsie sau în materialul necroptic prin hibridarea *in situ*. Secțiunile tisulare incluse în parafină sunt deparafinate, rehidratate şi supuse digestiei cu *pronază K* (protează). După treapta denaturării, fragmentele de ADN marcat (proba – un oligonucleotid sintetic sau un fragment de ADN al HSV clonat, amplificat într-o plasmidă) este incubat cu secțiunea tisulară, urmată de spălare pentru îndepărtarea ADN nehibridat. ADN din probă, hibridat cu ADN tisular se evidențiază prin metoda adecvată, în funcție de marcajul probei (radiologică, enzimatică sau chemiluminiscență).

De cele mai multe ori, în clinică, evidențierea IgG specific anti-HSV ete suficientă. În infecția primară, IgG apare concomitent cu IgM. Diferența între infecția primară şi cea recurentă se face pe baza afinității înalte a IgG anti-HSV.

Epidemiologie. HSV este probabil, cel mai frecvent virus în populația umană. Omul este singura gazdă naturală, iar infecția latentă în ganglioni este rezervorul de virus. Virusul se transmite

prin intermediul picăturilor de salivă, numai din leziunile deschise labiale sau gingivale şi respectiv ale mucoasei vaginale în care virusul se multiplică. În faza de latenţă, virusul nu se transmite.

Vaccin. Astăzi nu există un vaccin omologat pentru profilaxia HSV. Faptul că reinfecţia este posibilă, iar restimularea răspunsului imun la o nouă recurenţă nu previne recurenţele ulterioare, a fost argumentul că vaccinarea este inutilă. Totuşi, infecţia cu HSV-1 diminuează incidenţa şi severitatea infecţiilor genitale cu HSV-2. În serul prostituatelor se găsesc anticorpi specifici, dar rolul lor protector este minim, datorită localizării speciale a virusului.

Virusul varicela zoster (VZV)

Varicela şi *zona zoster* sunt 2 sindroame clinic distincte produse de acelaşi virus.

Varicela este o denumire nepotrivită – diminutiv de la variolă – care sugerează afinitatea acestui virus cu smallpox şi cu poxvirusurile, afinitate care nu există.

Varicela este consecinţa *infecţiei primare*. Perioada de incubare este de 2 săptămâni. Este o infecţie generalizată cu exantem, a copiilor de vârstă şcolară, se transmite prin aerosoli şi este foarte contagioasă. Virusul pătrunde pe cale *respiratorie* şi se multiplică în celulele epiteliale ale *tractului respirator*, *orofaringelui* sau *conjunctivei*. De aici virusul trece în sânge şi realizează faza *viremiei primare*.

În timpul viremiei primare, VZV se disemineză prin celulele SFM, la sisteme multiple de organe, unde se multiplică în celulele endoteliale ale vaselor sanguine mici. După multiplicarea în organe, se produce *viremia secundară.*

Viremia secundară este asociată cu *erupţia eritematoasă veziculară* (rash), iniţial cu aspect macular, care evoluează repede în vezicule pline cu lichid, infiltrat cu leucocite. Veziculele fac crustă în câteva zile şi se vindecă în 2–3 săptămâni.

Erupţia are grade variate de severitate. Implicarea SNC este rară. La adulţi, infecţia este mai severă. Cea mai severă complicaţie este *pneumonia.* Femeile gravide sunt foarte sensibile la pneumonia cu varicelă.

Din celulele epiteliale, virusul infectează *terminaţiile nervoase senzitive* şi este transportat la *ganglionii senzitivi*, unde produce *infecţia latentă.*

Infecţia cu VZV fiind diseminată, latenţa se stabileşte în toţi ganglionii senzitivi. Reactivarea este indusă de imunosupresie, traumatisme etc. În ganglioni are loc multiplicarea, iar de aici virusul se disemineză prin transport axonal, într-un dermatom specific, infectează celulele epiteliale şi se multiplică productiv, cu leziunile specifice.

Patogeneza VZV este puţin cunoscută datorită dificultăţilor de cultivare şi numărului mic de modele experimentale. Virusul este abundent în leziunile tegumentare, chiar în stadiul maculo-papular, dar izvorul de infecţie şi calea de transmitere sunt puţin cunoscute. Transmiterea pe calea aerului (fără să necesite contactul direct) din leziunile tegumentare şi din leziunile orale asimptomatice, care preced leziunile tegumentare, este foarte probabilă, deoarece ADN VZV este uşor detectat prin PCR în aerul din atmosfera pacienţilor. Poarta de intrare a virusului este calea respiratorie, deşi virusul nu se izolează din tractul respirator. În erupţia de varicelă, rata de atac clinic a VZV este de 70–90% dintre indivizii sensibili.

După multiplicarea la poarta de intrare, în substrat celular necunoscut, virusul se disemineză în organele limfoide secundare, unde are loc al II-lea ciclu de multiplicare, în limfocitele T. Probabil că virusul se multiplică şi în alte ţesuturi (plămân, creier), dar infecţia acestor organe, de regulă, nu se manifestă clinic. Implicarea amplă a acestor organe produce maladii grave.

Examenul histologic al leziunilor tegumentare evidenţiază ECP: celulele infectate sunt mai mari decât cele normale şi conţin incluzii nucleare acidofile. Leziunea tegumentară se extinde şi centrul este plin cu lichid clar, care ulterior se tulbură cu infiltratul celulelor inflamatorii. Incheierea procesului infecţios este marcată de uscarea pustulelor, formarea crustei şi regenerarea epiteliului.

Latenţa. După infecţia primară, virusul rămâne latent în unul sau mai mulţi ganglioni ai rădăcinilor dorsale ale nervilor spinali şi cranieni. Ganglionii trigeminali şi toracici sunt cel mai adesea implicaţi, dar şi alţi ganglioni pot să conţină ADN VZV. În timpul latenţei, ADN viral persistă sub formă episomală, circularizat. În timpul latenţei, majoritatea genelor sunt inactive. Virusul se reactivează în ganglioni şi progresează centrifug, spre periferie, prin fibrele senzitive, pentru a produce

leziuni tegumentare tipice de herpes zoster, limitate la dermatomul inervat de filetele neuronilor ganglionului sediu al latenței. Reactivarea virusului este asociată cu modificări inflamatorii intense în ganglionul implicat, reflectată în durerea severă ce însoțește multiplicarea virală. Reactivarea VZV este cunoscută sub denumirea de *zona zoster*. Nu se cunosc cauzele care determină reactivarea virusului latent.

Zona zoster (ZZ) este o maladie infecțioasă endemică, ce apare la persoanele mai vârstnice, imunocompromise şi se caracterizează printr-o erupție veziculară dureroasă, limitată la *dermatomul* inervat de ganglionul în care s-a reactivat VZV. Denumirea de *zona zoster* reflectă manifestările clinice ale recurenței, limitate la o zonă tegumentară bine delimitată.

ZZ nu se corelează cu expunerea la virusul exogen. Ea pare a fi o manifestare *secundară*, datorată reactivării virusului varicela care a rămas latent. Reactivarea virusului varicelei este asociată cu *declinul imunității generale* şi nu este indusă de factorii de stres care activează HSV. Reactivarea şi recurențele iau forma *erupției unilaterale*, limitată la un *singur dermatom*, adică aria tegumentară inervată de un singur ganglion senzitiv. Reactivarea este asociată cu diseminarea virusului în tot dermatomul inervat de neuronii ganglionului în care s-a produs activarea şi duce la *leziuni necrotice* în dermatom.

VZV infectează numai omul. Rezervorul natural este virusul latent din ganglionii senzitivi.

Nevralgia post-herpetică atât de caracteristică reactivării VZV poate să reflecte distrugerea țesutului nervos.

Probabilitatea recurențelor VZV creşte cu vârsta.

Diagnosticul infecției cu VZV se pune prin examenul la microscopul electronic a lichidului recoltat din veziculele timpurii de varicelă sau de zona zoster, în care se observă particule virale.

Frotiul din raclajul din profunzimea leziunii, colorat cu metoda Papanicolau sau cu albastru de metilen, relevă prezența celulelor gigante multinucleate. Efectul citopatic al VZV nu se distinge de HSV. De aceea, pentru identificare, citologia se asociază cu metoda imunofluorescenței.

β-*herpesvirusuri* – CMV (HHV5), HH6 şi HH7

Virusul citomegalic (CMV = HHV5) este denumit virusul glandelor salivare. Infecția cu CMV este comună (endemică) la toate populațiile umane (90%) şi este inaparentă chiar la nou-născut. 90% din populația adultă este infectată. Rareori este asociată cu manifestări clinice la gazdele cu reactivitate imunitară normală, datorită controlului de către celulele TCD_8^+.

CMV are un spectru îngust de gazdă: s-a izolat de la şoarece, cobai, primate. La gazdele sensibile este diseminat în toate sistemele de organe. Se crede că CMV produce o infecție persistentă pentru toată durata vieții, cu rezervor de celule infectate latent şi celule infectate persistent, care eliberează intermitent virus infecțios, dar nu există dovezi că infecția latentă poate fi reactivată la o infecție dectectabilă clinic. Numeroase tipuri celulare sunt infectate în majoritatea sistemelor de organe.

In vitro, CMV infectează un număr limitat de tipuri celulare, se multiplică lent, adeseori cu formarea celulelor gigante (fig. 422). Receptorul pentru HCMV pare a fi molecula CMH I.

CMV are specificitate de gazdă. Chiar la gazda naturală, unele celule sunt mai sensibile decât altele. Unele celule nu sunt lizate de infecție, sunt infectate persistent şi au rol important în păstrarea virusului ca agent infecțios.

HCMV produce circa 8% din cazurile de mononucleoză infecțioasă, iar la persoanele imunodeficitare, CMV este un patogen semnificativ, producând morbiditate şi mortalitate. Severitatea infecției este proporțională cu gradul imunosupresiei.

CMV este cauza cea mai frecventă a deficiențelor nou-născuților: surditate, retardare mintală. La pacienții SIDA produce retinită şi orbire.

In vivo, manifestările clinice apar lent. Multiplicarea lentă se datorează faptului că proteinele virale se sintetizează în cantități mici şi necesită un interval lung pentru a se acumula la un nivel suficient.

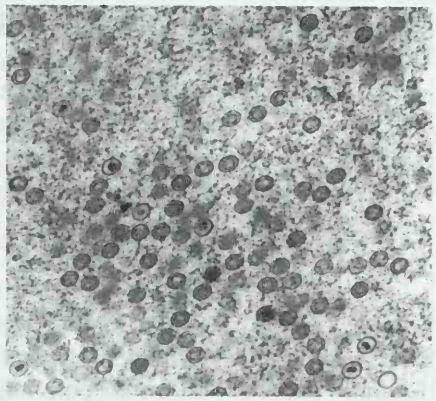


Fig. 422. Nucleocapside CMV în nucleul celulelor HEp-2, x 80.000 (original).

Grupele de persoane cu risc înalt de infecție:

- CMV traversează placenta. Infecția *in utero* produce malformații congenitale;
- receptorii de alogrefe supuși tratamentului imunosupresiv, fie datorită reactivării virusurilor latente endogene, fie datorită infecției cu virusul din organul transplantat;
- pacienții SIDA, unde rata infecției cu CMV atinge 95%, fiind cea mai comună infecție oportunistă.

Gazdele imunocompromise fac infecții pulmonare, hepatită, nefrită, encefalită sau/și o incidență crescută a infecțiilor bacteriene și fungice.

HCMV pare a fi în stare latentă în celulele precursoare ale liniei mieloide și se reactivează sub acțiunea citokinelor proinflamatorii.

După infecția primară, virusul este eliminat prin urină, în secrețiile genitale (inclusiv în lichidul spermatic), în salivă, în secreția lactată, dar este detectabil în special în leucocite.

Epidemiologie. Virusul se transmite pe orizontală prin contactul cu fluidele pozitive pentru virus și necesită contactul direct cu materialul infecțios: urină, salivă, lacrimi, spermă, secrețiile cervixului uterin și în secreția lactată, fluide în care este eliberat pentru perioade lungi de timp. Virusul se transmite cu ușurință prin aerosolii salivari în condiții de mare aglomerație, iar transmiterea pe cale sexuală este condiționată de prezența virusului în spermă și în secrețiile cervixului. Virusul este transmis prin transfuzia de sânge și prin transplantul de organe. Transmiterea pe verticală are loc transplacentar (în timpul sarcinii), perinatal sau prin laptele matern. Transmiterea placentară este caracteristică β-herpesvirusurilor, dar nu celor α sau γ.

Patogeneza. Infecția este litică și de lungă durată, deoarece imunitatea nu controlează multiplicarea și diseminarea virusului. CMV exercită potențialul patogenic și prin mecanisme nelitice: modulează funcțiile normale ale celulei gazdă prin expresia limitată a genomului său, sau influențează funcțiile celulare prin inducția sintezei citokinelor. CMV produce mononucleoza infecțioasă, febră, hepatita post-transfuzie datorită transmiterii virusului de la donor, maladii reumatologice, malignități ale tractului urogenital și probabil chiar în dezvoltarea aterosclerozei coronare.

CMV infectează aproape toate sistemele de organe: histologic, apar celule refractare mari (citomegalic) cu incluzii nucleare în formă de 'ochi de bufniță'.

Diagnosticul constă în evidențierea agentului (virus, proteine virale, acizi nucleici) în fluide și țesuturi sau răspunsul serologic al pacienților.

Virusul se evidențiază prin cultivare pe substrat permisiv: fibroblaste umane primare.

Pe lângă virionii infecțioși, celulele infectate cu HCMV produc alte 2 tipuri de particule:

- particule neînvelite, nu conțin genom, dar conțin proteinele tegumentului și capsidei ;
- corpi denși, acestea fiind proteine ale tegumentului, învelite, fără capsidă și genom.

HH-6 și *HH-7* – roseolovirusuri – infectează aproape toți copiii (95%) și produc febra infantilă cu erupție tegumentară asemănătoare rujeolei, la circa 10%. Cele 2 virusuri produc infecții benigne și autolimitate, dar la imunocompromiși (pacienții SIDA și cei cu alogrefă) infecția primară sau reactivată este gravă. HH-6 pare a fi asociat cu maladii neurologice: epilepsie, encefalită și scleroză multiplă. HH-6 și HH-7 sunt limfotrope și neurotrope: infectează și rămân latente în celulele stem leucocitare și în neuroni. Ciclul multiplicării cu liza celulei, are loc în limfocitele TCD_4, atât *in vitro*, cât și *in vivo*.

HH-6 s-a izolat de la pacienții SIDA, cu maladie limfoproliferativă. Are tropism pentru celulele T și este înrudit serologic cu CMV. S-au identificat 2 variante: A (rol etiologic necunoscut) și B (agentul exantemului febril subitum – roseola – copilăriei). Contaminarea cu HH-6 începe timpuriu în copilărie și atinge 90% la populația adultă. Virusul persistă latent în glandele salivare și se transmite de la mamă la copil, prin salivă.

HH-7 s-a izolat din celulele CD_4 de la indivizi normali.

HH-6 și HH-7 au efect modulator direct și indirect asupra sistemului imunitar, ce favorizează persistența în limfocitele TCD_4. Efectele directe constau în liza limfocitelor TCD_4 infectate și, sub acțiunea citokinelor, în apoptoza limfocitelor învecinate. Efectele indirecte sunt consecința modulării densității expresiei unor molecule implicate în activarea răspunsului imun: CD_3, CD_4.

HH-8 este co-factorul decisiv al inducției sarcomului Kaposi, prin dereglarea producerii citokinelor și hormonilor.

γ-herpesvirusuri. Virusul Epstein-Barr (*Lymphocryptovirus*)

EBV a fost descris de D. Burkitt (1964) într-o tumoră cu apariție restrânsă la copiii din Africa. Este un herpesvirus limfotropic, deși limfocitele sunt nepermisive pentru multiplicare, cu potențial oncogen. S-au definit 2 linii de EBV: 1 și 2, fără distribuție geografică specifică. Cele 2 subtipuri au omologie extinsă a genelor ce codifică antigenele nucleare. *In vitro*, EBV1 imortalizează mai eficient limfocitele B.

Gazda naturală a EBV este omul și câteva primate: gibonul, maimuța bufniță.

La om, EBV infectează preferențial limfocitele B, prin receptorul CR_2 ($CD21^*$). O moleculă asemănătoare pe celulele epiteliului squamos orofaringian poate să medieze infecția productivă a acestor celule, care poate să continue la unii indivizi, ca o infecție cronică, adică multiplicare urmată de liză celulară, cu eliberarea virusului și infecția altor celule. Epiteliile sunt situsuri privilegiate, favorizante ale persistenței virale, datorită accesului limitat al limfocitelor T. EBV infectează celulele B din criptele tonsilare, urmată de latență cu expresia limitată a genelor și imortalizarea celulei latente, activarea celulei și proliferarea, amplificând numărul de celule infectate la poarta de intrare. Limfoblastele B trec în sângele periferic și se disemineză sistemic. Prezența lor în circulație stimulează răspunsul celulelor T. Infecția latentă este compatibilă cu diviziunea celulei.

CD_{21} (sau CR_2, adică receptorul pentru complement, de tip 2, ce leagă C_{3d}) este o *glicoproteină membranară*. Receptorul CD_{21} are rol în activarea normală a limfocitelor B. În timpul activării cascadei C, C_3 este clivat în C_{3b}, care se leagă de complexele Ag-Ac. C_{3b} este prelucrat proteolitic și rezultă C_{3d}. C_{3d} atașat de complexul Ag-Ac, se fixează la limfocitul B, pe calea CR_2. C_{3d} este ligandul natural pentru CR_2.

Genomul viral nu se integrează în ADN celular, dar persistă sub forma unui episom circular închis, prin legarea covalentă a secvențelor terminale repetate. Curând după infecție, episomul se replică și rezultă copii multiple, care ulterior se replică odată cu ADN celular, cu distribuție egală în cele 2 celule fiice, permițând ca numărul de copii de ADN viral să rămână constant. ADN episomal poate fi activat, virusul trece în ciclul litic, cu liza celulei și formarea virusului progen.

Infecția primară, în timpul copilăriei, este de cele mai multe ori subclinică, urmată de starea de purtător pentru toată viața, caracterizată printr-un echilibru între nivelul infecției și intensitatea RIMH și RIMC.

La copii, EBV infectează latent limfocitele B din tonsile, unde epiteliul de suprafață este discontinuu și virusul are acces direct la limfocite. Infecția inițială a celulelor B, predominant neproductivă, este datorată expresiei genelor de latență, urmată de activare celulară și proliferare, amplificând populația de celule infectate la poarta de intrare.

În limfocitul B infectat latent, ADN viral persistă sub forma unui număr constant de molecule genomice circulare închise. *In vitro*, limfocitele infectate cu EBV sunt imortalizate, se divid și generează liniile limfoblastoide (LLB).

Pentru a nu se dilua în populația limfocitelor B, care se divid, genomul viral trebuie să se replice. În celula infectată latent se sintetizează proteinele de latență, cu rol în replicarea genomului: 6 EBNA (1– 6), 3 proteine de membrană și 2 tipuri de ARN poliadenilate.

O mică *proporție a limfocitelor B infectate latent*, devin permisive pentru multiplicarea virală. Virionii progeni reinfectează celulele epiteliale ale orofaringelui și astfel virusul se propagă în populația umană. Infecția primară este foarte contagioasă, deoarece virusul se multiplică în epiteliul orofaringian și în glandele salivare și se transmite prin salivă (boala sărutului).

Imortalizarea limfocitelor B. In vitro, limfocitele B mici, în repaus, infectate latent cu EBV, se activează, adică intră în diviziune, cu creșterea expresiei HLA-DR, a volumului nucleului și citoplasmei. După 36 ore, este inițiată sinteza ADN și la 72 de ore celulele se divid. In acest timp, se sintetizează predominant IgM, detectabil în citoplasmă și în mediu, ca rezultat al activării policlonale a celulelor B. Activarea duce la *imortalizare permanentă.* După inițierea sintezei ADN, celulele continuă să prolifereze *in vitro*, ca *l*inie *c*elulară B *l*imfoblastoidă pozitivă pentru EBV (LCL). O minoritate (<1–10%) dintre celulele LCL, la un moment dat, intră în ciclul litic productiv.

În laborator, EBV se foloseşte pentru imortalizarea limfocitelor B. Cele mai multe linii de celule B imortalizate, produc cantităţi mici de virus infecţios.

Proteinele latenţei. Virusul codifică circa 70 de proteine de dimensiuni medii. În celulele infectate *latent* se sintetizează 11 tipuri de molecule (*9 proteine* şi *2 tipuri de ARN* cu dimensiuni mici, abundente cantitativ, dar netraduse, cu funcţie necunoscută), altele decât moleculele sintetizate în ciclul litic. Cele 9 proteine sunt localizate *în nucleu* şi în *citoplasmă* şi sunt exprimate în celulele infectate latent, în plus faţă de proteinele imediate, timpurii şi tardive, asociate cu ciclul litic.

EBNA (Epstein Barr Nuclear Antigen), grupul cel mai important al proteinelor latenţei, s-a detectat prin IF directă în nucleul limfocitelor B imortalizate cu EBV. S-au identificat 6 proteine EBNA: 1, 2, 3A, 3B, 3C şi proteina leader (LP), toate traduse dintr-un ARNm policistronic prin înnădire alternativă.

Alte proteine ale latenţei au localizare membranară: LMP1, esenţială pentru imortalizare şi proliferarea continuă a celulelor B, inductoare a fenotipului tumorigenic; LMP2A şi LMP2B, se sintetizează prin înnădire alternativă de la un ORF.

Proteinele ciclului litic. Genele ciclului litic sunt omologe cu ale altor virusuri herpetice şi urmează o cascadă ordonată, expresia fiecărui set fiind activată de setul anterior şi inhibat de următorul. Genele sunt grupate în timpurii immediate (IE), timpurii (E) şi tardive (L), exprimate înainte şi respectiv după replicarea genomului. Genele IE, în număr de două, au rolul de a transactiva genele E, comutând astfel infecţia latentă în infecţia litică. Genele E codifică circa 30 de proteine, unele difuze (D), cu localizare nucleară şi citoplasmatică şi proteine R (restricted), cu localizare restrânsă la nucleu. Majoritatea au funcţii enzimatice pentru replicarea ADN viral. Genele L codifică antigenele capsidei virale (VCA), proteine neglicozilate, identificate cu dificultate datorită absenţei unui sistem litic *in vitro*.

Glicoproteinele sunt inserate în membrana celulei infectate. Din setul celor 10 identificate, câteva devin componente ale învelişului viral. Glicoproteina majoră a învelişului (gp340) mediază legarea virusului pe membrana limfocitului B, la CR_2. Anticorpii anti-gp320 sunt neutralizanţi. Glicoproteina 85 mediază fuziunea peplosului cu membrana celulei.

Epidemiologie. Gazdele naturale ale EBV sunt omul şi câteva primate. Circa 90% din populaţia adultă este infectată cu EBV, îl păstrează tot restul vieţii în limfocitele B şi elimină virus progen prin salivă. Sursa de infecţie nu este determinată şi de aceea, perioada de incubare se stabileşte cu dificultate, dar pare a fi necesară o perioadă de 30–50 de zile înainte de apariţia simptomelor. Infecţia primară se face prin contactul direct cu un individ producător de virus. Virusul se transmite prin sărut, pe cale sexuală (s-a detectat în spermă), prin sângele transfuzat, prin organele transplantate. EBV este endemic în ţările subdezvoltate: 90% dintre copii fac o infecţie subclinică. In ţările dezvoltate, infecţia clinică are cea mai mare frecvenţă între 15–25 ani. Infecţia timpurie conferă rezistenţă la infecţia ulterioară. De aceea, adolescenţii şi adulţii tineri rareori fac infecţii clinice cu EBV. In studiile seroepidemiologice, prezenţa sau absenţa IgG anti-VCA (antigenul capsidei virale) este definitorie, deoarece IgG apare timpuriu în infecţia primară şi persistă toată viaţa. Seropozitivitatea creşte cu vârsta şi atinge 90% la adulţi. Sunt două perioade cu rata maximă a *seroconversiei*: 1–6 şi 14–20 ani. Cele mai multe seroconversii sunt subclinice, dar infecţia în perioada adolescenţei sau tinereţii poate fi asociată cu mononucleoza infecţioasă. Detectarea EBV (prin imortalizarea limfocitelor B) în probele de salivă, spălături nazofaringiene, arată că excreţia orală a virusului se face continuu sau intermitent, la cei mai mulţi indivizi seropozitivi.

IgM şi IgA anti-Ag capsidei virale şi IgG anti-Ag timpurii ating valoarea maximă în faza acută a MI şi scad în convlescenţă. In MI se sintetizează o diversitate de auto-Ac: aglutinine la rece, FR, anticorpi anti-nucleari, anti-plachetari şi anti-muşchi neted, datorită stimulării policlonale a limfocitelor B. Auto-Ac sunt tranzitorii şi inofensivi.

Patogeneza

VEB produce mononucleoza infecţioasă (MI), o maladie limfoproliferativă autolimitată, benignă. Infecţia limfocitelor B, predominant neproductivă (latentă), cel puţin *in vitro*, poate evolua litic, cu producerea de virus progen. EBV1 imortalizează mai eficient limfocitele B din *criptele tonsilare*, urmată de *latenţă* cu expresia limitată a genelor, activarea celulei şi proliferarea, amplificând

numărul de celule infectate la poarta de intrare. Limfoblastele B trec în sângele periferic şi se diseminează sistemic. Prezenţa lor în circulaţie stimulează răspunsul celulelor T, al căror număr creşte semnificativ (mononucleoză).

Denumirea de *mononucleoză infecţioasă* se datorează existenţei celulelor mononucleate atipice în sângele periferic. Morfologic, celulele atipice sunt limfocite mari activate (10–20 μm), care la coloraţia May Grunwald Giemsa evidenţiază o citoplasmă abundentă, vacuolată, nucleu alungit şi indentat, cromatină granulară. Acestea sunt *celule* TCD_8 citotoxice (15 x 10^9/l), *activate specific faţă de Ag EBV şi determină leucocitoza* observată în primele 2 săptămâni de MI. Limfocitele TCD_8 sunt active faţă de antigenele care se sintetizează în ciclul litic al EBV, dar puţin eficiente faţă de Ag sintetizate de celulele infectate latent. Un număr mic de celule mononucleare atipice apar în sânge şi în alte infecţii virale acute: CMV, VHB, influenza B, rubela, dar sunt cele mai evidente în MI.

Celulele TCD_4 şi NK activate cresc numeric în MI, celulele B sunt de obicei în număr normal sau cresc uşor, sunt infectate în proporţie de $1/10^4$–10^5 şi exprimă toate proteinele infecţiei virale latente.

Testele anormale ale funcţiei hepatice care reflectă gradul distrugerii tisulare se găsesc la 80–90% dintre pacienţi. Enzimele hepatice cresc în 2–3 săptămâni de MI şi revin la normal la 5 săptămâni.

MI apare la adolescenţi şi la adulţii tineri, ca rezultat al infecţiei primare şi începe abrupt cu durere în gât şi de cap, adenopatie cervicală. Simptomele sunt nespecifice (senzaţia de frig, febră, transpiraţie, stare de rău general, anorexie, disconfort abdominal vag datorită limfadenopatiei). Ruperea splinei este o complicaţie cunoscută dar rară a MI, după traumatisme de intensitate medie. Ruperea produce durere bruscă şi intensă şi necesită intervenţie chirurgicală imediată.

Virusul infectează celulele epiteliului orofaringian sau celulele B din tonsile, unde epiteliul de suprafaţă este discontinuu şi virusul are acces direct la limfocite. Infecţia iniţială a celulelor B este urmată de expresia genelor de latenţă, activare celulară şi proliferare, amplificând populaţia de celule infectate la poarta de intrare.

Limfocitoza MI este însoţită de depresia celor mai multe funcţii ale limfocitelor T, inclusiv a HSÎ.

Simptomele MI nu sunt cauzate direct de celulele B infectate de EBV, ci de natura imunopatologică, datorată sintezei masive de citokine de către celulele TCD_8 şi mai puţin de către CD_4 şi NK. Aceste celule controlează infecţia şi elimină limfoblastele infectate, dar unele scapă lizei şi realizează infecţia persistentă pentru restul vieţii. Anticorpii anti-glicoproteine virale sunt neutralizanţi.

Eliberarea continuă a EBV, la nivel scăzut, în epiteliul orfaringian se produce la cei mai mulţi indivizi seropozitivi şi poate fi detectată prin testul imortalizării limfocitelor B sau prin evidenţierea ADN viral prin metoda PCR, în salivă sau în spălătura bucofarigiană.

Virusul realizează o infecţie latentă stabilă într-o populaţie de celule B de memorie, cu viaţă lungă. Aceste celule evită acţiunea de supraveghere a RI prin expresia unui număr foarte limitat de gene. Reactivarea periodică a infecţiei latente şi evoluţia litică, permite producerea virusului progen, diseminarea lui şi refacerea populaţiei de celule infectate latent.

Celulele TCD_8 activate specific faţă de Ag EBV se găsesc la toţi indivizii seropozitivi, asimptomatici. Proteina EBNA1 nu este recunoscută de limfocitele TCD_8, pentru că este rezistentă la degradarea în proteasom. Astfel se stabileşte un echilibru al infecţiei, la nivel subclinic. Starea de purtător este caracterizată printr-un echilibru între nivelul infecţiei şi intensitatea RIMH şi RIMC.

Alterarea echilibrului prin infecţii intercurente sau prin medicamente imunosupresoare, determină apariţia manifestărilor clinice ale infecţiei EBV.

MI este stopată prin acţiunea mecanismelor imunitare: celulele T elimină majoritatea celulelor B infectate cu VEB, iar anticorpii neutralizanţi limitează diseminarea infecţiei la alte celule.

Diagnosticul poate fi suspectat pe baze clinice şi pe examenul morfologic al sângelui (limfocite atipice, dar diagnosticul de certitudine este *serologic*: prezenţa Ac faţă de antigenele capsidei EBV (VCA = antigenele capsidei virale).

IgM şi IgA anti-Ag capsidei virale şi IgG anti-Ag timpurii ating valoarea maximă în faza acută a MI şi scad în convlescenţă. In MI se sintetizează o diversitate de auto-Ac: aglutinine la rece, FR, Ac anti-nucleari, anti-plachetari şi anti-muşchi neted, datorită stimulării policlonale a limfocitelor B. Auto-anticorpii sunt tranzitorii şi inofensivi.

Testele anormale ale funcției hepatice, care denotă distrugere tisulară (celulară) se regăsesc la 80–90% dintre pacienți. Enzimele hepatice cresc în săptămânile 2–3 de manifestări clinice şi revin la normal în săptămâna a 5-a.

Analiza *histologică* a MI se face pe tonsile, pe splina ruptă. Aceste țesuturi sunt infiltrate cu mononucleare (TCD_8), cu aspect morfologic de imunoblaste.

Metoda clasică pentru evidențierea virusului infecțios în probele pacienților este *testul imortalizării limfocitelor*, în care limfocitele EBV negative sunt expuse la contactul cu proba şi apoi sunt cultivate. Prezența virusului în probă este indicată de creşterea celulelor B imortalizate. Expresia CD_{23} este esențială pentru imortalizare. Celulele se divid după 72 de ore şi eliberează IgM. *In vitro*, EBV are rolul unui activator policlonal al celulelor B. Dacă proporția celulelor B infectate este mare, *in vitro* apar linii celulare limfoblastoide (LCL) imortalizate spontan. Metoda imortalizării nu se foloseşte în mod curent pentru că este laborioasă. Liniile imortalizate de limfocite B produc cantități mici de virus infecțios.

Inițial, celulele mici în repaus suferă blastogeneză, cu creşterea volumului celular şi a densității HLA-DR.

Un test mai rapid constă în numărarea, într-o linie de celule EBV negative, a celulelor care se infectează după 72 ore de contact cu proba. Evaluarea numerică se face după colorarea pentru *Ag EBNA*.

Detectarea ADN prin *PCR* a înlocuit aceste teste, fiind o metodă mai rapidă şi mai sensibilă.

EBV se distinge de alte herpesvirusuri, prin capacitatea de a transforma celulele B *in vitro*, iar *in vivo* este asociat cu o varietate de tumori limfoide şi epiteliale*: limfomul Burkitt, maladia Hodgkin, carcinomul nazofaringian.*

Limfomul Burkitt şi *carcinomul nazofaringian* apar la indivizii seropozitivi, ca rezultat al modifcărilor genetice în celulele infectate. Limfomul Burkitt este o neoplazie foarte malignă a limfocitelor B, strâns asociată cu infecția VEB. Apare la copiii de 3–15 ani, cu incidență maximă la 6–7 ani. Este mai frecventă la băieți şi apare în aria maxilarului. Netratată, evoluează letal în câteva luni de la apariția simptomelor clinice. Neoplazia este foarte sensibilă la *ciclofosfamidă*, dar recurențele apar şi sunt tot mai puțin sensibile la terapie. Este endemică în Africa ecuatorială şi Papua Noua Guinee şi sporadică în toată lumea. In zonele endemice, limfomul reprezintă circa 90% dintre malignitățile copilăriei, în contrast cu 3% în țările occidentale. Forma endemică este limitată în zonele hiperendemice cu malaria *P. falciparum*. Infecția malarică acționează ca stimulator cronic al celulelor B în centrele germinative, dar şi ca imunosupresor general, producând a diminuare a IMC specifice față de Ag EBV şi creşterea numărului de celule B infectate în sânge. Creşte rata de turnover a celulelor B, dar scade rata eliminării celulelor B EBV pozitive. In celulele tumorale s-a evidențiat genomul şi Ag EBV. Efectul transformant se explică prin aceea că genomul EBV produce translocație, rezultatul fiind activarea oncogenei *c-myc*.

Carcinomul nazofaringian (NPC) este o tumoră malignă a epiteliului squamos al nazofaringelui.

EBV are, probabil, capacitatea să transforme limfocitele B şi poate să determine *limfomul Hodgkin* (HL). In 40% dintre tumorile HL, pe suprafața celulelor Reed-Sternberg se găsesc Ag virale: LMP_1 (latent membrane protein) şi $EBNA_2$, sugerând că proteinele virale ar avea rol în dezvoltarea limfomului. HL este de 2–5 ori mai frecvent la pacienții care au avut mononucleoză infecțioasă. Dar 60% dintre cazurile de HL nu au antigene EBV. Se poate admite că EBV nu are totdeauna rol în transformarea malignă a limfocitelor limfomului Hodgkin, iar prezența proteinelor se datorează coincidenței cu prezența virusului în organism.

Bibliografie

Crawford D. H. 2004. *Epstein Barr* Virus, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Birmans B., Reibstein I., Steiner I. 1993. Characterization of an *in vivo* reactivation model of *herpes simplex* virus from mice trigeminal ganglia 1993. J. of Gen. Virol. 74, 2487–2491.

Blacklaws B. A., Nash A. A. 1998. *Herpes simplex* virus, Infection and Immunity, în vol. Encyclopedia of Immunology, second edition, ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.

Roizman B. 1996. *Herpesviridae*, în vol. Fields Virology, third edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.
Avitabil E., Di Gaeta S., Torrisi M. R., Ward P. L., Roizman B., Campadelli-Fiume G. 1995. Redistribution of Microtubules and Golgi Apparatus in *Herpes Simplex Virus*-Infected Cells and Their Role in Viral Exocytosis. Journal of Virology, vol. 69, no. 12, pp. 7472–7482.
Minison A. C. 1998. *Alphaherpesviruses: Herpes Simplex* and *Varicella-Zoster*, în vol. Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, ed. by Leslie Collier, A. Balows, M. Sussman.
Roizman B., Sears A. E. 1990. Herpes Simplex Viruses and Their Replication, în vol. Virology, second edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.
Pellett P. E., Black J. B. 1996. Human *Herpesvirus 6*, în vol. Fields Virology, Third Edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.
Gelb L. D. 1990. *Varicella-Zoster* Virus, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York,.
Cohen J. I., Straus S. E. 1996. *Varicella-Zoster Virus and Its Replication*, în vol. Fields Virology, third edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.
Braun D. K., Dominguez G. , Pellett P. E. –1997. *Human herpesvirus 6* – Clin. Microbiol. Rev. 10, 521–567.
De Clercq E. 1997. In search of a selective antiviral chemotherapy. Clin. Microbiol. Rev. 10, 674–693.
Kimberlin D. W. 2004. Neonatal *Herpes Simplex* Infection. Clin. Microbiol. Rev. 17, 1–13.
Norkin L. 1995. Virus Receptors : Implications for Pathogenesis and Design of Antiviral Agents. Clin. Micr. Reviews 8, 2, pp. 293–315.
Cleator G. M., Klapper P. E. 2004. *Herpes simplex 1*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.
Mihăescu Gr. 1985. Inhibition of some deoxyriboviruses replication cycle in tannic acid pretreated cells. Rev. Roum. Biol. 30, 2, 175–179.
Mihăescu Gr. 1985. Macrosegregation of nucleolar components of HEp-2 line cells after tannic acid treatment. Rev. Roum. Biol. 30, 1, 152–156.
Forsgren M., Klapper P.E. 2009. *Herpes simplex* virus Type 1 and Type 2, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, sixth edition, Editors Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, Barry D. Schoub, Paul D. Griffith, Philip Mortimore, John Wiley & Sons, Ltd.
Carter J. B., Saunders V. A. 2007. Virology: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Ltd.
Kalejta R. F. 2008. Tegument Proteins of Human *Cytomegalovirus*. MMBR, 72, 2, p. 249–265.
Grifith P. D. *Cytomegalovirus*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, 2004, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.
Griffiths P. D. 1998. *Cytomegalovirus,* Infection and Immunity, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed., ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.
Staczek J. 1990. Animal *Cytomegaloviruses* – Microbiol. Rev., 54(3): 247–265.
Stinski M. F. 1990. *Cytomegalovirus and Its Replication*, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York,.
Britt W. J. 1998. *Betaherpesviruses: Cytomegalovirus, Human Herpesviruses 6* and *7*, în vol. Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, edited by Leslie Collier, 1998.
Gompels U.A. 2004. *Roseoloviruses – HH6* and *HH7*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.
Arvin A. M. 1996. *Varicella-zoster virus*. Clin. Microbiol. Rev. vol. 9, p. 361–381.
Breuer J. 2004. *Varicella zoster virus*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.
Forsgren M., Klapper P.E. 2009. *Herpes simplex* virus type 1 and type 2, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, sixth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, Barry D. Schoub, Paul D. Griffith, Philip Mortimer, John Wiley & Sons, Ltd.

21.15. Familia Parvoviridae

Parvovirusurile sunt printre cele mai mici şi cele mai simple ca structură, dintre virusurile cu genom ADN. Virionii nuzi au 20–26 nm, simetrie icozaedrică, sunt foarte rezistenți la inactivare şi la 56^0 timp de o oră, stabili la pH între 3–9, dar inactivați de ß-propiolactonă, formaldehidă şi agenți oxidanți. Virionii sunt alcătuiți exclusiv din ADN şi proteine.

Capsida este alcătuită din 2 proteine (VP1 şi VP2) codificate de o secvență comună prin schimbarea cadrului de citire. VP2, proteina majoră a capsidei, este identică cu regiunea C-terminală a VP1.

Familia este împărțită în două subfamilii:

- *Parvovirinae*, infecțioase pentru numeroase animale cu sânge cald: păsări domestice, diferite mamifere, inclusiv omul;
- *Densovirinae*, infecțioase pentru insecte.

Fiecare subfamilie are 3 genuri. Subfamilia *Parvovirinae* cuprinde următoarele 3 genuri, cu asemănări genomice semnificative:

- *Parvovirus* se multiplică *autonom* în celulele mamaliene care cresc şi se divid, ale speciilor sensibile. Multiplicarea unor parvovirusuri în celulele umane este mult stimulată prin co-infecţia cu adenovirusuri; parvovirusul canin (CPV), virusul panleucopeniei felinelor;
- *Dependovirus (AAV= adeno associated viruses)*, exceptând condiţiile speciale, pentru multiplicare, necesită *co-infecţia* cu un adeno- sau cu un herpes. Nu produc manifestări clinice;
- *Erythrovirus* (parvovirusul B_{19}), cu tropism pentru celulele precursoare ale eritrocitelor, produce eritem infecţios, un exantem comun al copilăriei.

Virionul are o structură simplă. Capsida, cu simetrie icozaedrică, este alcătuită din 60 de capsomere şi conţine trei proteine (P_1, P_2, P_3) cu secvenţe de aminoacizi parţial suprapuse.

Genomul mc, linear, este printre cele mai mici (alături de hepadna, papova) şi are circa 5000 baze. Datorită dimensiunilor mici ale genomului, proteinele sunt codificate de cadre de citire care se *suprapun parţial*. Genele codificatoare sunt localizate între buclele terminale, în două casete genice: cea stângă codifică 2–4 proteine *reglatoare* (nestructurale) ce controlează replicarea ADN, iar cea dreaptă codifică 2–3 proteine *structurale* (capsidale) cu secvenţe parţial suprapuse de aminoacizi, traduse din ARNm înnădite alternativ.

Cele mai multe parvovirusuri autonome conţin o catenă de ADN de *polaritate negativă*, complementară ARNm. La unele virusuri (AAV, *Densovirus, B_{19}*), virionii conţin catena de complementaritate pozitivă sau negativă, în proporţii egale.

Genomul are secvenţe palindromice la capetele 5' şi 3' ale catenei antimesager. La capătul 3', palindromul are circa 115 baze, la AAV, palindromul terminal are 125 de baze, iar la parvovirusul B_{19}, peste 300 nucleotide lungime. Datorită naturii palindromice, capătul 3' se pliază înapoi faţă de propria-i secvenţă şi formează o structură în *buclă de ac de păr* (hairpin), prin formarea legăturilor de H între secvenţele complementare.

Capătul 5' (capătul drept) palindromic şi formează o nouă buclă în ac de păr, dar secvenţa este complet diferită de a capătului 3'. Excepţia este virusul B_{19}, la care secvenţele celor două capete sunt identice.

Palindroamele nu sunt totdeauna perfecte. Secvenţa 5' nu este totdeauna unică, ci poate fi repetată în ordine inversată (flip-flop).

Strategii de codificare. Dimensiunile mici ale genomului au condus la evoluţia unor variate strategii pentru codificarea proteinelor necesare unei infecţii productive: doi *promotori* (unul la capătul stâng, iar al II-lea este tot în jumătatea stângă), *înnădirea alternativă* a mesagerilor, utilizarea unui *codon neobişnuit* de *iniţiere a traducerii*, *clivajul* proteolitic.

Multiplicarea. Parvovirusurile autonome par a fi foarte specifice pentru gazdă şi au un tropism tisular foarte specific. Receptorii celulari pentru parvovirusuri par să conţină *acid sialic*, deoarece pretratarea celulelor cu NA inhibă ataşarea virusului.

Parvovirusurile se multiplică în *nucleul celulei* şi au un grad înalt de dependenţă de funcţiile celulei. Genomul de dimensiuni mici codifică un număr mic de proteine, iar multiplicarea depinde de proteinele celulei gazdă. Unele proteine (ADN-pol) ale celulei cu rol în replicarea ADN viral sunt disponibile numai în faza S a ciclului celular, când are loc sinteza ADN propriu, ceea ce limitează multiplicarea virusului la faza S, în contrast cu multiplicarea virusurilor herpetice care codifică sinteza propriilor enzime de replicare a ADN şi virusul se multiplică în orice fază a ciclului celular.

Replicarea genomului. Molecula ADN monocatenar este o structură neobişnuită pentru replicare şi are 2 particularităţi:

- existenţa secvenţelor palindromice terminale scurte, care se pliază înapoi şi creează un duplex telomeric în formă de buclă în ac de păr. La genomul heterotelomeric buclele terminale sunt diferite ca secvenţă una de cealaltă. La cel homotelomeric, ele formează o parte a secvenţei terminale repetate ce poate fi directă sau repetată. Buclele terminale sunt esenţiale pentru strategia unică a replicării ADN: modelul buclei rotative, un marker invariant al familiei;

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

– replicarea genomului are loc în nucleul celulei, este catalizată de ADN-pol celulară prin mecanismul de auto-primare şi generează o moleculă lineară dublu-catenară. Sinteza noilor catene progresează printr-un mecanism unic, al dislocării (înlocuirii) unei catene, astfel că nu există sinteza unei catene *lagging*. Virionii progeni au o catenă de ADN de polaritate pozitivă sau negativă.

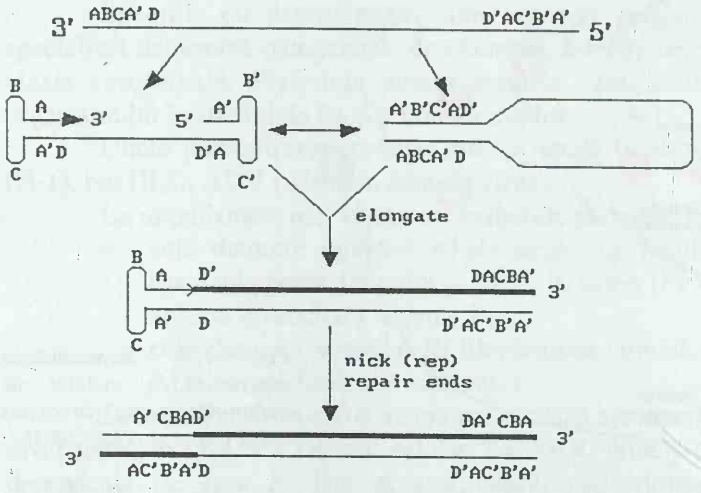


Fig. 423. Modelul replicării ADN monocatenar al parvovirusurilor. La capetele catenei se găsesc secvenţe palindromice repetate invers care formează bucle în ac de păr. Secvenţa de la capătul 3' are rol de primer pentru sinteza catenei complementare. Rezultă astfel intermediarul dublu catenar de replicare (după Berns, 1990).

Toate ADN-polimerazele necesită un primer şi o matriţă. Capetele moleculei genomice lineare conţin secvenţe palindromice, identice sau diferite, cu rol de primer. Gruparea 3'OH de la capătul are rol de primer, la care se leagă enzimele de replicare, iar catena creşte în direcţia 5' --- 3'.

* Nu se ştie dacă lanţul parental se pliază simplu faţă de capătul 3', pentru a servi ca primer pentru iniţierea replicării, sau dacă SRI terminale trebuie mai întâi să-şi împerecheze bazele. Varianta ultimă este mai probabilă, pentru că un astfel de *duplex terminal* este echivalentul structural al intermediarului dublu catenar de replicare, de la care se iniţiază ciclurile de replicare.

ADN mc este convertit la ADN dc sub acţiunea ADN-pol celulare. După conversia la forma dc, ADN este replicat printr-un mecanism al buclei în ac de păr.

Transcrierea. ARN-pol II a celulei transcrie genele virale, iar factorii celulari ai transcrierii sunt esenţiali. Copiile primare sunt prelucrate prin înnădire şi rezultă ARNm de două clase dimensionale:

– cele mari codifică proteine NS, care se fosforilează şi controlează expresia genelor şi replicarea ADN;
– cele mici codifică proteinele structurale.

Proteinele structurale se asamblează în precapsidă, în care este încorporat ADN viral de polaritate pozitivă sau negativă. Una dintre proteinele NS funcţionează ca helicază şi despiralizează ADN dc, astfel ca o singură catenă să fie împachetată.

Infecţia cronică. Parvovirusurile autonome produc frecvent, *in vivo,* infecţii cronice latente în substratul semipermisiv (un nivel scăzut al multiplicării), dar nu s-a evidenţiat integrarea ADN viral în ADN celular. Echivalentul *in vitro* este evoluţia independentă de tip *echilibrat*, cu stabilirea stării de *purtător*: proporţia celulelor permisive este mică. Apar însă frecvent variante virale ce pot infecta majoritatea celulelor. S-a observat şi evoluţia inversă, în cursul căreia celulele rezistente apar din clone de celule sensibile.

Multiplicarea parvovirusurilor (fig. 424) necesită trecerea celulelor prin faza S. De aceea, *in vivo*, cele mai ample leziuni se produc după infecţia *in utero* şi a animalelor nou născute. Infecţia organismelor adulte este mai puţin virulentă, deşi în ţesuturi se găsesc celule care se divid. Sensibilitatea la infecţia cu parvovirusuri este dependentă nu numai de faza S a celulei, ci şi de *starea ei de diferenţiere*. Se crede că *dediferenţierea* prin transformare poate conferi sensibilitate la infecţia cu parvovirusuri, dar transformarea *per se* nu este suficientă.

BUCUREŞTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

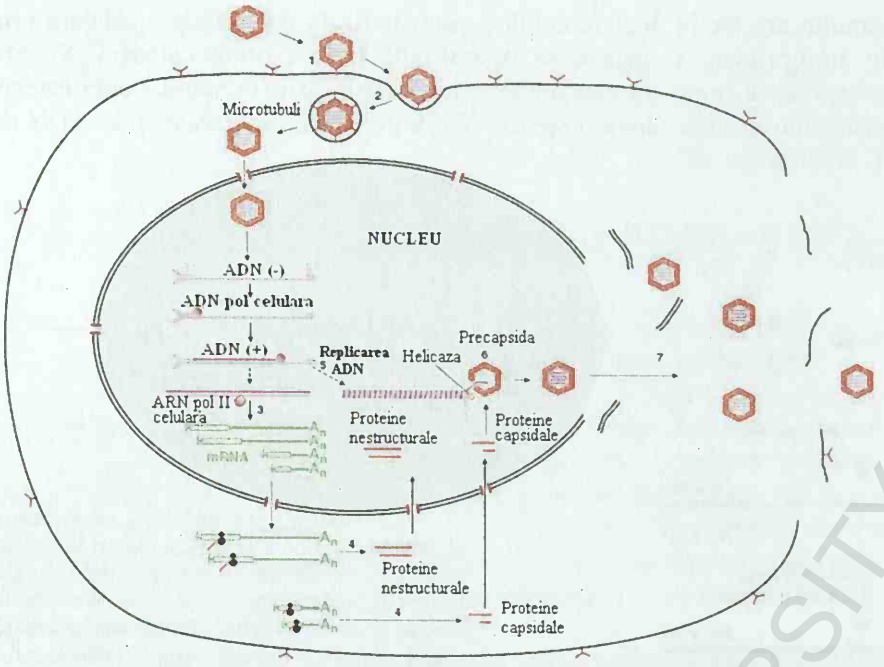


Fig. 424. Reprezentarea schematică a ciclului de multiplicare a unui parvovirus (după Carter şi colab, 2007).

Multiplicarea *Dependovirus* (AAV) necesită co-infecţia cu virusuri neînrudite, pentru funcţia helper: adeno-, herpes, *inductoare ale fazei S*. În absenţa virusului helper, AAV pot produce o infecţie latentă *in vitro*, ce implică *integrarea ADN într-un situs unic al cromosomului 19*.

Cel mai eficient factor pentru ca celulele să devină permisive la multiplicarea AAV, este infecţia cu un adenovirus helper sau cu un herpesvirus (HSV-1, HSV-2, CMV). Genele timpurii ale adenovirusurilor au rol de helper (E1a, E1b, E2a, E4).

Suprainfecţia substratului celular purtător de provirus parvoviral, cu adeno- sau herpes, induce *excizia genomului integrat* şi iniţierea infecţiei productive. Genele adenovirusului influenţează expresia genelor parvovirale: favorizează transcrierea ARNm şi transportul lor în citoplasmă, stimulează traducerea ARNm. De aceea, s-a presupus că AAV este integrat în cromosomul 19, ca o strategie a latenţei, în absenţa virusului helper. Infecţiile latente cu *Dependovirus* s-au găsit la numeroase linii celulare umane şi de primate.

Dependenţa multiplicării AAV de virusul helper nu este absolută. Trăsătura particulară a biologiei lor este lipsa permisivităţii celulelor *in vitro*, dacă nu sunt expuse la ceea ce se consideră a fi *"condiţii toxice"*. Expunerea câtorva tipuri de linii celulare la factorul termic, radiaţii UV, cicloheximidă (blochează ciclul celular la *graniţa G_1-S*), hidroxiuree şi carcinogeni chimici, face celulele permisive pentru multiplicarea virală sau permite acumularea ARNm virali şi replicarea ADN viral, în absenţa co-infecţei cu un virus helper. *Concluzia este că la AAV, la virusurile helper (adeno-, herpetice) şi în celulele umane se găsesc gene care au un mecanism reglator comun.* Aceste rezultate pun la îndoială existenţa unei dependenţe speciale între adenovirusuri şi AAV. Mai probabil, multiplicarea AAV este dependentă de mediul celular, care poate fi permisiv sau nepermisiv. Co-infecţia cu un virus helper (adeno-, herpes) modifică mediul intracelular şi celula produce ambele tipuri de virioni.

Radiaţia UV produce leziuni ale moleculei de ADN, care activează *mecanismele de reparare*. Probabil activarea căilor de reparare induce efecte celulare favorabile multiplicării AAV.

Prin definiţie, virusurile sunt entităţi cu un parazitism de tip special, absolut, de nivel genetic. Pentru toate virusurile, există substraturi celulare permisive şi nepermisive. Se crede că AAV au elaborat o strategie care le permite să stabilească un raport stabil cu celula, *atâta timp cât fiziologia celulei este nealterată*. Dacă celula este lezată, este activată multiplicarea productivă a AAV şi virusul ajunge la o nouă gazdă. Acest mod de multiplicare implică o formă superioară de parazitism.

In vivo, ciclul viral este mai puţin cunoscut. AAV este contaminant al izolatelor de adenovirusuri. Se presupune că infecţia naturală cu AAV se face pe cale respiratorie sau gastro-intestinală, ca şi cu adenovirusuri. Nu se ştie care sunt ţesuturile sau organele infectate latent în organismul uman: ar putea fi celulele liniei hematopetice, tractul genital feminin.

SOUTH CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

AAV s-au găsit cu o frecvență mare (20%) în biopsiile din mușchii striați. Cromosomul 19 codifică pentru troponină, dar mușchiul scheletic nu este infectat cu adeno- sau cu herpes după inoculare intravasculară. Astfel, mușchiul striat poate fi un rezervor de virus protejat de activarea cu virusul helper. Pentru că fibrele musculare sunt multinucleate, integrarea AAV și posibila inactivare a genei troponinei produce efecte minime. Dar nu s-a evidențiat integrarea genomului viral în cromosomul 19 din probele infectate de la om.

Infecțiile cu parvovirusuri sunt adeseori persistente și uneori, asimptomatice. Tropismul specializat determină patogeneza: de exemplu, infecția cerebelului în timpul dezvoltării fetale duce la ataxia congenitală. Preferința pentru celulele care se divid rapid explică sensibilitatea înaltă a organismului în stadiul de făt și a nou născuților.

Unele parvovirusuri produc infecții fetale la animale: porcine (PPV), bovine (BPV), gâscă (H-1), om (B_{19}), ADV (Aleutian disease virus).

La organismele mai vârstnice, maladiile parvovirale sunt de 2 categorii:

- cele datorate *infecției virale acute*, ca rezultat al multiplicării în țesuturile sensibile (panleukopenia felinelor – FPV, la suine (PPV) și bovine, hepatita la hamster și gâscă, aplazia eritrocitară la om – B_{19})
- cele *datorate activării RI* (dezordinea cronică cu CI produsă de Aleutian disease virus – ADV, amplificată de vaccinare).

Latența. Parvovirusurile autonome necesită aproape în mod absolut, o populație de celule care se divid rapid, în faza S a ciclului celular. La AAV, principiul este același, dar virusul helper suplinește dependența de faza S. Din această cauză, parvovirusurile produc infecții persistente și uneori asimptomatice, *in vivo*, inclusiv la om, dar și *in vitro*, în celula intactă. Culturile celulare primare eliberează frecvent virusuri după stimularea adecvată sau odată cu degenerarea culturii. 20% dintre culturile celulare de AGMK și 1–2% dintre culturile embrionare umane de rinichi sunt infectate latent, natural.

Infecția cu AAV, în absența co-infecției cu un virus helper (adeno, herpes-1, herpes-2, CMV, papiloma, virus vaccinal), este *latentă:* genomul AAV este exprimat într-o măsură limitată și se replică. Latența este însoțită de *integrarea* ADN viral, în cromosomii perechii 19. Integrarea se face sub forma copiilor dublu-catenare repetate în tandem. Se presupune că infecția latentă *in vivo* este comună la om, dar nu este asociată cu manifestări cunoscute.

În celula suprainfectată cu un virus helper, genomul AAV este excizat din inserțiile sale și se asamblează virus progen infecțios.

Infecția latentă poate fi indusă *in vitro*, prin inocularea cu AAV la multiplicitate înaltă (10–1000 UI/celulă) a liniilor continui de celule umane, în absența virusului helper. Infecția a rămas latentă peste 50 de pasaje. ADN viral este, de cele mai multe ori, *integrat în ADN celular*, sub forma câtorva copii repetate în *tandem* (cap-coadă), capetele genomului viral fiind, de cele mai multe ori, în joncțiune strânsă cu secvența ADN celular. Joncțiunea cu secvențele celulare este mediată de secvențele terminale. Integrarea are specificitate de situs în cromosomul 19 și se face prin recombinare neomologă, deși există 4–5 baze omologe. Deși are specificitate de situs, integrarea nu se face strict la nivelul unei nucleotide, ci are loc într-o secvență de câteva sute de nucleotide.

Secvențele integrate se pot *exciza* spontan. Nu se știe dacă excizia este o etapă inerentă a replicării sau dacă excizia precede replicarea.

Supresia oncogenezei. Parvovirusurile sunt unice printre virusurile nucleare ADN prin faptul că nu au fost niciodată implicate în oncogeneză. Multe parvovirusuri s-au izolat din celulele maligne. Aceste virusuri nu induc malignizarea, dar celulele tumorale au devenit permisive pentru multiplicare, rezultatul fiind liza.

Adenovirusurile produc sarcoame hemoragice la situsul injectării la puii nou-născuți de hamster sirian. Adăugarea AAV la inocul, prelungește perioada de inducere și scade frecvența neoploziilor. *In vitro*, AAV inhibă transformarea cu adenovirusuri.

Proteinele NS acționează ca reglatori *trans* (sunt active asupra altor gene decât cele care le-au codificat), pozitivi sau negativi ai expresiei genice.

Virusul B_{19} are tropism pentru celulele eritroide. Receptorul este antigenul P de grup sanguin (un globozid), prezent pe precursorii eritrocitelor, pe megacariocite, pe celulele endoteliale, pe placentă, pe celulele fetale cardiace, pe eritrocitele mature, ceea ce explică tropismul tisular limitat.

Virusul infectează, în primul rând, precursorii eritrocitelor în măduva osoasă, dar şi alte celule (ficatul fetal). Efectul multiplicării virusului este întreruperea producerii eritrocitelor, iar la pacienţii imunocompromişi se instalează anemia. Infecţia cronică poate să producă moartea fătului.

Virusul se găseşte în sânge şi în secreţiile tractului respirator. Probabil, virusul se transmite pe cale respiratorie, parenteral prin transfuzia sanguină şi a derivatelor sale, dar şi pe verticală, de la mamă la făt, prin placentă. În faza viremiei, virusul se transmite prin sânge.

La adult, infecţia cu virusul B_{19} implică articulaţiile mâinilor şi genunchilor, tabloul patologic fiind asemănător artritei reumatoide. Artropatia durează perioade variabile: săptămâni sau chiar ani.

Perioada de incubaţie este de 1–3 săptămâni. Viremia apare la o săptămână după infecţie şi durează o săptămână, timp în care virusul se găseşte în secreţia nazofaringiană, ceea ce denotă că se eliberează prin faringe.

Virusul B_{19} este larg răspândit, iar procesul infecţios evoluează tot timpul anului, la toate grupele de vârstă, sub forma epidemiilor explozive sau a cazurilor sporadice. Infecţia este mai frecventă la copii. Antigenele virale induc sinteza IgM şi IgG. Circa 60% dintre adulţi sunt seropozitivi.

Virusul infectează indivizii imunosupresaţi, incapabili să sintetizeze Ac neutralizanţi. Anticorpii au rol esenţial pentru eradicarea infecţiei. Administrarea preparatelor imunoglobulinice comerciale poate să vindece sau să amelioreze infecţiile persistente cu parvovirusul B_{19}. Globozida cu rol de receptor de virus se găseşte pe epiteliul placentei: infecţia la făt evoluează rapid, cu creşterea ratei de turnover a eritrocitelor, pe fondul imaturităţii sistemului imunitar. Virusul B_{19} se dezvoltă în miocard şi miocardita este asociată cu insuficienţa cardiacă.

Patogenia virusului B_{19} are două componente: infecţia litică a celulelor sensibile şi interferenţa cu răspunsul imun. La voluntari, viremia atinge nivelul maxim în zilele 8–9 (10^{11} virioni/ml) şi este asociată cu limfopenie, neutropenie, trombocitopenie, cu scăderea numărului de reticulocite şi a cantităţii de hemoglobină.

Nu există vaccin faţă de infecţia cu virusul B_{19}, dar sunt vaccinuri faţă de infecţiile parvovirale la pisică, câine, porc.

Harta genetică. Un ORF în partea dreaptă a genomului, codifică cele 3 proteine ale capsidei virale. Schimbarea cadrului de citire şi mutantele de deleţie în această regiune nu blochează replicarea ADN.

În jumătatea stângă a genomului există un alt ORF. Se numeşte regiunea *rep*, deoarece orice mutaţie frameshift sau prin deleţie, blochează *replicarea ADN.*

Este posibilă deleţia selectivă a regiunii *rep* şi obţinerea unor variante moleculare genomice în care replicarea ADN este blocată. Expresia proteinei *Rep* este însă esenţială pentru integrarea la situs specific în cromosomul 19.

Vectorii recombinanţi AAV ce poartă o genă selectată, flancată de secvenţele terminale (TR), dar deletaţi pentru gena *rep*, nu se integrează în cromosomul 19, ci se integrează la alte situsuri, nespecifice.

Vectorul AAV se foloseşte pentru *terapia genică.* Vectorii recombinanţi AAV pot să transducă gene într-o varietate de ţesuturi ale căror celule nu se divid: celulele globului ocular, SNC, muşchi, ficat, plămân. Genomul vector AAV persistă perioade lungi: 2 ani în muşchi, SNC, ochiul rozătoarelor, fără diminuarea expresiei genice.

Utilizarea AAV ca vector genic este avantajoasă: injecţia AAV ca vector nu stimulează răspunsul inflamator, răspunsul limfocitelor T este de mică intensitate, comparativ cu alţi vectori, deoarece AAV nu infectează eficient CPA.

Bibliografie

Berns K. I. 1990. *Parvoviridae* and Their Replication, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Berns K. I. 1996. *Parvoviridae:* The Viruses and Their Replication, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.

Heegard E. D., Brown K.E. 2002. Human *Parvovirus B19* – Clin. Microbiol. Rev. 15, 485–505.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Berns K. I. 1990. *Parvovirus* Replication. Microbiol. Rev. 54 (3): 316–329.
Zuckerman A. J., Banatvala J. E., Pattison J. R., Griffith P. D., Schoub B. D. 2004. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, John Wiley & Sons, Ltd.
Carter J. B., Saunders V. A. 2007. Virology: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Ltd.

21.16. Familia Poxviridae

Denumirea "pox" provine de la cuvântul englezesc "pock" (pustulă, ulcerație). Familia *Poxviridae* include cele mai mari și mai complexe virusuri, patogene pentru om și animale, la care produc infecții generalizate, cu erupții veziculare sau pustulare cutanate (variola, vaccina) sau tumori benigne la om (*Molluscum contagiosum*) și la iepure (fibromul Shope).

Poxvirusurile sunt clasificate în 2 subfamilii:

- *Chordopoxvirinae*, infecțioase pentru vertebrate;
- *Entomopoxvirinae*, infecțioase pentru nevertebrate: *Melolontha* (coleopter), *Amsacta moori* (lepidopter), *Chironomus* (dipter).

În funcție de gazdă se disting 8 genuri de poxvirusuri infecțioase pentru vertebrate: *Orthopox* (variola, vaccina etc.), *Parapox (Orf)*, *Capripox* (infecțioase pentru ovine, caprine), *Leporipox* (virusul mixoma, transmis de țânțar, produce leziuni tegumentare la anumite genuri de *Leporidae*; virusul fibromului Shope, transmis de un artropod, produce papilomul Shope la iepurele de viziună *Sylvilagus* în America de Nord), *Suipox* (infecțios pentru porc), *Avipox* (infecțios pentru păsari), *Molluscipox* (produce tumori benigne la om) și *Yatapox* (produce tumori benigne la primate). Ultimele două nu se cultivă.

Structura. Cel mai studiat este virusul vaccinei, cu formă paralelipipedică (cărămidă cu colțurile rotunjite) și dimensiuni de 220 x 220 x 280 nm. Altele au formă elipsoidală, cu dimensiuni de 400 x 230 nm, la limita de rezoluție a microscopului optic.

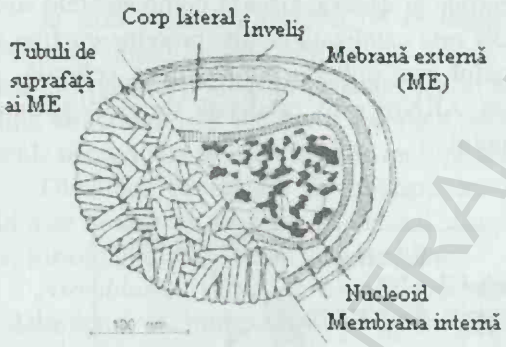


Fig. 425a. Reprezentarea schematică a structurii virionului pox (după Buller, 1991).

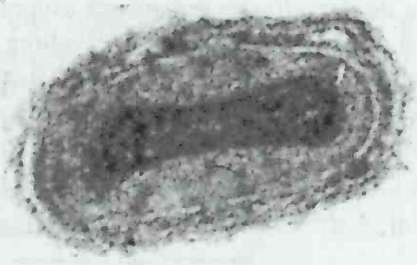


Fig. 425b. Imagine electrono-optică a secțiunii virionului vaccinal. În regiunea centrală se distinge nucleoidul electronodens. Regiunea centrală este acoperită de membrana externă și de învelișul extern, ambele pluristratificate, x 160.000, original.

Virionul este format dintr-un *nucleoid*, bine delimitat pe imaginile electrono-optice ale virusului în secțiune frontală, în care se găsește ADN viral, având de fiecare parte câte o masă laterală, denumită *corp lateral*. În virion, nucleoidul are formă de disc biconcav, cu aspect de halteră și este acoperit de *membrana internă* omogenă și de un *strat extern* alcătuit din subunități cilindrice scurte, cu aspect striat (fig. 425a).

Zonele concave ale nucleoidului sunt ocupate de corpii laterali, de natură proteică. La exterior se găsește *membrana externă*, de natură lipoproteică, care conține toate fosfolipidele virionului, colesterol și grăsimi neutre. Membrana externă este tapetată cu structuri de formă tubulară, vizibile la microscopul electronic pe preparatele colorate negativ (fig. 425 b). La unele tulpini de virus, în diferite substraturi celulare, virionul dobândește un *înveliș lipidic extern* suplimentar.

Compoziția chimică. Componentele principale ale virionului sunt proteinele (90%), lipidele (5%) și acizii nucleici (3,2%). Proteinele se solubilizează la 100° în prezența SDS și a unui agent reducător. La electroforeza bidimensională se disting circa 100 de proteine, dar potențialul de codificare a genomului este mult mai mare. Numai în înveliș se găsesc 10 polipeptide, dintre care 9 sunt glicozilate.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reprezentanții familiei *Poxviridae* codifică un set de enzime mult mai diversificat în comparație cu alte virusuri, unele esențiale pentru desfășurarea ciclului de multiplicare, iar altele neesențiale. Dintre cele esențiale fac parte *ARN-polimeraza* dependentă de ADN, enzimele de prelucrare post-transcriere a ARN (de bonetare și adenilare), *ADN-polimeraza* și *topoizomeraze ADN* (enzime care modifică conformația spațială a ADN, prin ruperea catenelor, producând relaxarea ADN suprahelical, în absența unui cofactor energetic). Discontinuitățile create prin clivarea unei catene sunt reunite prin acțiunea *ligazei*, din echipamentul enzimatic al virionului.

Genomul poxvirusurilor este o moleculă de ADN dublu catenară, lineară, care conține 130–300 kbp (85000 kDa la parapoxvirusuri și 185000 kDa la avipoxvirusuri), distribuite în circa 200 de gene. Capetele celor două catene au o conformație în buclă de ac de păr, cu secvențe terminale repetate invers, identice, dar orientate pe catene opuse. Secvențele terminale ale celor două catene sunt *legate covalent* și formează un lanț nucleotidic continuu. Repetițiile terminale inversate includ secvențe codificatoare, ceea ce face ca unele gene să se găsească la ambele capete ale genomului. Prin denaturare, molecula devine lineară monocatenară. Funcțional, genomul este organizat în circa 180 ORF. Majoritatea genelor esențiale sunt localizate în partea centrală a genomului, iar genele neesențiale (favorizează multiplicarea *in vitro*) sunt localizate la capete.

Poxvirusurile, iridovirusurile insectelor și virusul febrei suine africane au o particularitate unică printre dezoxiribovirusuri: ciclul de multiplicare se desfășoară *în citoplasmă*, fiind total independent de nucleul celulei, deoarece codifică aproape toate funcțiile necesare replicării genomului. Experimental, s-a demonstrat că replicarea genomului acestor virusuri are loc și în celulele *enucleate* cu citocalazina B.

Ciclul de multiplicare (fig. 426). Virionul este înglobat în celulă, prin pinocitoză mediată de receptori, a căror structură moleculară nu este cunoscută. Se presupune că factorul de creștere epidermică (EGF) ar avea rolul de *receptor de virus*. Prima treaptă a dezvelirii este catalizată de proteina de *dezvelire* ce acționează asupra regiunii centrale și dezorganizează componentele stratului extern și a membranei interne. Dezvelirea finală a ADN este catalizată de alte proteine-enzime virale care hidrolizează membrana externă și astfel nucleoidul este eliberat din regiunea centrală. ADN genomic purificat nu este infecțios, deoarece sinteza ARNm este catalizată de *ARN-polimeraza* dependentă de ADN, o enzimă din echipamentul virionului.

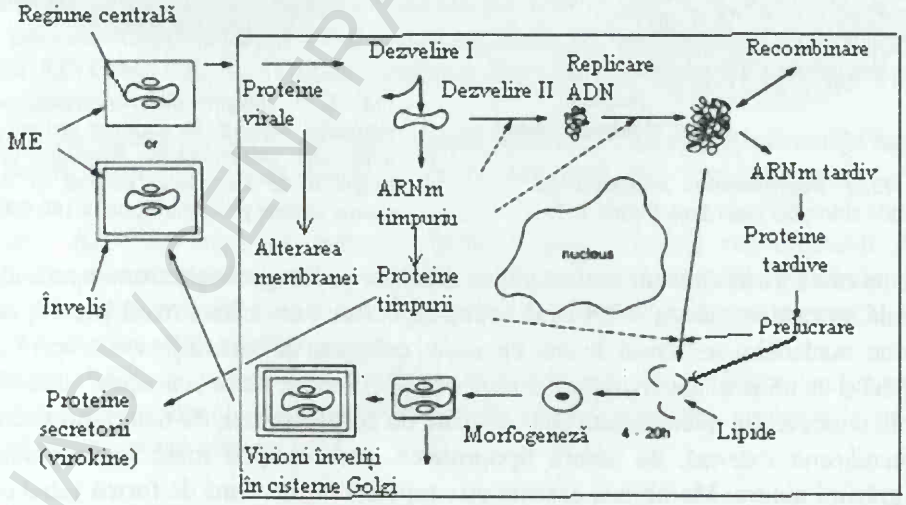


Fig. 426. Reprezentarea schematică a ciclului de multiplicare a unui poxvirus (după Buller și colab., 1991).

Expresia genelor are loc în 2 faze: timpurie și tardivă. Genele fiecărei faze au promotori caracteristici.

În etapa timpurie este transcrisă circa jumătate din setul de gene și se sintetizează peste 50 de proteine, printre care și proteina de dezvelire. În acest stadiu este stopată sinteza macromoleculelor

specifice celulei. Genele timpurii codifică enzmele implicate în sinteza nucleotidelor (timidin-kinaza, ribonucleotid-reductaza) şi ADN-polimeraza.

Replicarea ADN viral începe în primele 6 ore după infecţie şi furnizează circa 10000 de copii genomice. Replicarea implică mecanismul self-priming. Genomul celorlalte dezoxiribovirusuri are o singură origine a replicării, dar la poxvirusuri, având dimensiuni mult mai mari, prezintă puncte multiple de iniţiere a replicării, ca şi ADN al celulei eucariote. Replicarea începe la ambele capete ale genomului la nivelul *inciziilor monocatenare* produse de o *DN-ază virală* şi progresează prin mecanismul deplasării uneia dintre catenele parentale. ADN progen pare a fi sintetizat prin intermediul unor molecule concatemerice mari.

În ciclul de multiplicare, strâns legate de replicare, au loc evenimente de recombinare între moleculele genomice ale unor tulpini virale diferite (recombinare legitimă) sau recombinare cu molecule de ARN celular (recombinare nelegitimă), fenomen uşurat de absenţa împachetării stringente a ADN. Această particularitate a replicării oferă modalitatea diversificării informaţiei genetice, ceea ce a permis evoluţia şi dobândirea unor funcţii noi. Virusul ce produce fibromul malign al iepurelui pare a fi recombinant între virusul fibromului Shope şi virusul mixoma.

Pentru sinteza replicativă a ADN, poxvirusurile codifică sinteza a cel puţin 2 enzime implicate în metabolismul nucleotidelor: *timidin-kinaza (Tk) şi ribonucleotid-reductaza* (Rr), cu aceleaşi semnificaţii funcţionale pe care enzimele le au la herpesvirusuri. Gena Tk nu este esenţială pentru multiplicarea poxvirusurilor în celulele cultivate. Tk virală se deosebeşte de enzima celulară, dar conferă un avantaj selectiv pentru desfăşurarea ciclului infecţios în celulele care nu se divid şi au o rezervă scăzută de acid timidilic. În celule, activitatea Tk creşte brusc după infecţia cu poxvirusuri.

Ribonucleotid-reductaza (Rr) reduce ribonucleotidele la precursori ai sintezei ADN. ADN-polimeraza este codificată de virus, ceea ce permite desfăşurarea ciclului de multiplicare în citoplasmă. Polinucleotid-ligaza (enzima ce repară breşele în molecula de ADN) creşte de 10 ori în faza timpurie a multiplicării virale.

În faza tardivă a ciclului de multiplicare virală, este transcris restul informaţiei genetice. Genele programului *tardiv* codifică moleculele structurale majore ale virionului. Transcrierea nu este blocată de inhibitorii sintezei proteice sau ai replicării ADN, pentru că enzimele catalizatoare sunt proteine structurale ale regiunii centrale a virionului. Circa 30% din lungimea genomului codifică molecule neesenţiale pentru ciclul de multiplicare virală.

Dinamica procesului de multiplicare a fost analizată atât structural, cât şi prin metode biochimice la virusul vaccinal. Structural, asamblarea virusului începe în *incluzii de tip B*, în care se găsesc virioni în diferite stadii de asamblare.

Asamblarea. Virionii progeni se asamblează în interiorul unor zone ale citoplasmei, difuze sau bine delimitate, alcătuite din material fin-granular, denumite *viroplasmă.* Studiul ultrastructural al multiplicării *virusului vaccinal* a relevat procesul stadial complex al morfogenezei, cu participarea cisternelor aparatului Golgi, care formează învelişul extern al virionilor. Procesul asamblării, complex şi incomplet elucidat, comportă edificarea *de novo* a unor structuri *membranare* destinate să înglobeze o parte din materialele viroplasmei (fig. 427).

Creşterea, turnover-ul şi repararea membranelor celulare se face prin intercalarea componentelor structurale (proteine, lipide) în structurile preexistente. Biogeneza *de novo* a membranelor rămâne una dintre marile probleme ale biologiei. Pentru virusurile pox, există dovada morfologică ce arată că unele componente ale învelişului, sintetizate sub control viral, încep să se condenseze în membrane. Membranele sunt asamblate în focare viroplasmice discrete şi rămân separate de membranele celulare.

Membranele virale sintetizate *de novo* sunt detectabile în matricea viroplasmei şi au structură trilaminară, fiind tapetate la exterior de un strat dens de spiculi. Pe măsură ce membranele cresc, ele înconjură ADN nascent şi proteinele acumulate în viroplasmă.

Primele structuri detectabile electrono-optic în celulele infectate sunt nişte formaţiuni *semilunare* tridimensionale, ce constau dintr-o membrană dublă tapetată cu spiculi proeminenţi, ce formează o bordură în perie pe suprafaţa convexă şi un material granular, adiacent suprafeţei concave. Membranele sunt sintetizate *de novo* şi nu sunt asociate cu nici-un organit celular, ceea ce semnifică

faptul că proteinele trebuie transportate de la locul sintezei, la fabrica de virus. Spiculii conferă rigiditate structurilor semilunare şi determină dimensiunile particulei virale imature. Genomul viral şi proteinele asociate intră în învelişul imatur, înainte ca acesta să se închidă complet.

Fig. 427a. Imagine electrono-optică a fabricii de virus în celulele HEp-2 infectate cu virus pox, 120 000, original.

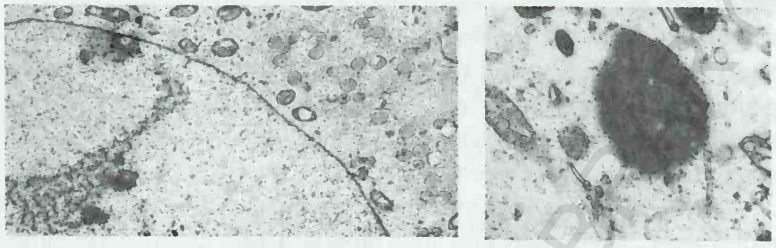


Fig. 427b. Stadiul iniţial al asamblării virionilor pox implică un proces de membranogeneză (stânga, x 66.000). În dreapta, asamblarea virionilor aglomeraţi într-o fabrică de virus, x 150.000 (original).

În interiorul structurilor delimitate de membrana dublă, începe condensarea nucleoidului. Virionii imaturi delimitaţi de membrana dublă asamblată *de novo* (viitoarea membrană internă a virionului matur) sunt transportaţi din aria de asamblare spre periferia celulei. Pe acest traseu, virionii se învelesc cu alte membrane suplimentare. Studiile cito-imunochimice sugerează ca virionii imaturi îşi asamblează membrana dublă externă la nivelul reţelei trans-Golgi, un compartiment intermediar între reticulul endoplasmic granular şi cisternele golgiene. Virionii cu membrana externă dublă (fig. 428, 429), pierd stratul extern al membranei, prin fuziune cu membrana citoplasmatică, pe măsură ce sunt eliberaţi din celulă. Din acest punct de vedere, se poate spune că poxvirusurile se eliberează prin înmugurire, dar la contactul cu membrana se pierde un strat al membranei externe.

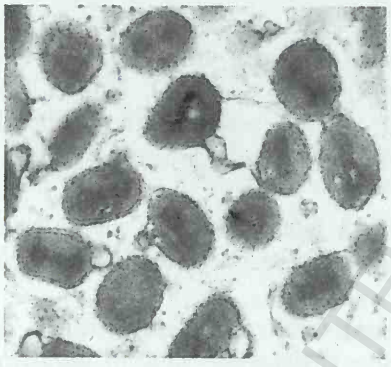


Fig. 428. Imagine electrono-optică a virionilor pox în secţiune. Învelişul extern este conferit de membranele cisternelor Golgi, x 180.000, original.

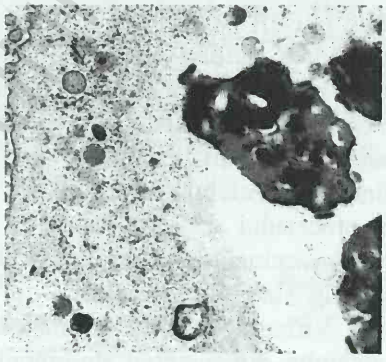


Fig. 429. Entomopoxvirus în celulele glandelor salivare de *Chironomus* sp. În stânga, câţiva virioni imaturi, neînveliţi. În dreapta, incluzii dense în conţinutul cărora se disting virioni, 100.000, original.

Unele poxvirusuri (cowpox, avipox, etc.) produc *incluzii de tip A*. Acestea sunt corpi mari, electronodenşi ce conţin ribosomi.

La electroforeza bidimensională, extractele virus-free din celulele infectate evidenţiază numeroase polipeptide structurale sintetizate în exces, dar şi numeroase proteine "solubile", biologic active, neesenţiale, care interferă cu mecanismele de apărare a gazdei, au rol în virulenţă sau îndeplinesc ambele funcţii. Astfel, s-a identificat *hemaglutinina*, o proteină a învelişului, dar prezentă şi în stare liberă în citoplasma celulei infectate. Foarte importante sunt proteinele din categoria *viroceptorilor*. Termenul semnifică produse genice virale care au omologie funcţională cu receptorii celulari de *citokine* (receptorul pentru IFN-γ, receptorul pentru IL-lβ, receptorul pentru TNF), inhibând mecanismele de apărare a gazdei, stimulate de citokine. Moleculele omologe receptorilor de citokine codificate de poxvirusuri se găsesc numai în formă "solubilă", nefiind componente structurale ale virionilor.

O altă categorie de molecule codificate de poxvirusuri sunt cunoscute sub denumirea de *virokine*. Termenul reuneşte molecule codificate de genele virale, care *au omologie funcţională cu*

citokinele şi influenţează funcţiile celulare într-un mod asemănător. Poxvirusurile codifică omologi ai EGF, un factor de creştere a endoteliului vascular, un inhibitor al serin-proteazei (serpin) ce inhibă activarea citokinelor şi diminuează procesul inflamator, proteine de legare a complementului (receptorul pentru C_4), proteine ce inhibă exprimarea moleculelor CMH I pe suprafaţa celulelor, diminuând recunoaşterea lor de către limfocitele Tc. Printre proteinele care modulează citokinele este o proteină inhibitoare a ICE (proteaza care generează forma activă a IL-1β), un receptor solubil pentru IL-1 care inhibă legarea IL-1β (dar nu legarea lui IL-1α sau IL-1-ra) de receptorul celular pentru IL-1.

Prin complexitatea lor biochimică, prin diversitatea enzimelor pe care le conţin, poxvirusurile se abat mult de la modelul general de structură a celorlalte virusuri. Faptul că ele se multiplică în citoplasmă, fără participarea enzimelor nucleare este o reflectare a complexităţii lor funcţionale. Deşi complexă şi diferită de a celorlalte virusuri, structura lor nu întruneşte particularităţile sistemelor biologice.

ECP. Virusul vaccinal este citocid pentru că inhibă sinteza ADN şi a proteinelor celulare. *Variola* este prima viroză controlată prin vaccinare şi singura eradicată. Variola produsă de virusul sălbatic produce o erupţie (rash) sistemică, febrilă, după o perioadă de incubaţie de 10–14 zile. După incubaţie, în 1–2 zile se produce erupţia tegumentară sistemică cu distribuţie centrifugă: pe mucoasa bucală, faţă, extremităţi şi mai puţin pe trunchi. Erupţia este maculară, dar evoluează în forma pustulară şi veziculară. Leziunile fac crustă şi cad la 14 zile.

Vaccinarea cu virusul vaccinal este eficientă profilactic, dar produce uneori complicaţii generalizate (200 cazuri la un million de vaccinaţi).

Parapoxvirus produce infecţii la ovine, caprine, bovine. Omul se infectează la contactul cu animalele infectate. La caprine şi ovine, parapox produce dermatita pustulară contagioasă (orf). Infecţia se face prin leziuni tegumentare. După infecţie se produce hipertrofia şi proliferarea celulelor epidermice şi infiltrarea leucocitelor.

Molluscum contagiosum (MC) este o tumoră benignă a pielii asemănătoare unui neg, la copiii preadolescenţi, dar poate să apară la adulţii imunocompetenţi, răspândită la populaţia de pe întreg globul. MC este considerată ca o infecţie specifică omului. Nu există dovada transmiterii infecţiei la animale, deşi leziuni asemănătoare s-au identificat la cal. Leziunile MC sunt globulare sau ovalare cu diametrul de 2–5 mm, pot să apară pe toată suprafaţa corpului, cu excepţia epiteliului palmar şi a mucoaselor şi pot fi asociate cu foliculii piloşi. Leziunile sunt mai severe la imunocompromişi şi la cei cu dermatită atopică. Tumorile sunt rezultatul unui proces hiperplazic, strict limitat la stratul epidermic al tegumentului (de aceea sunt clasificate ca acanthoma) şi sunt asemănătoare foliculilor de păr. Din zona centrală a leziunii se eliberează un fluid vâscos cu resturi celulare în care se găsesc virioni. Fluidul disemineză virusul infecţios. Dacă nu sunt perturbate mecanic leziunile MC persistă între 6 luni şi 5 ani la gazdele imunocompetente. Pot să dispară spontan, probabil sub acţiunea efectorilor imunitari. Dacă sunt lezate mecanic, leziunile se vindecă mai repede, dar favorizează suprainfecţia bacteriană. MCV este un indicator al stadiului tardiv al SIDA.

Virusul este transmis prin contactul cu exudatul descărcat din leziunile traumatizate prin acţiune mecanică şi prin contactul direct cu obiectele contaminate. MC este puţin contagios, iar pentru infecţie, doza inoculată trebuie să fie mare. Se transmite prin contact sexual dacă leziunile sunt situate pe sau în vecinătatea organelor sexuale.

Virusul pătrunde în epiderm prin microleziuni. După o perioadă de incubaţie cu durată variabilă, uneori lungă, prin hipertrofia epidermei se formează pustule, apoi un nodul ce se extinde în derm, dar membrana bazală rămâne intactă. În celulele infectate ale stratului bazal se formează incluzii pline cu virioni. Prin îmbătrânire, celulele migrează spre suprafaţă şi sunt înlocuite prin hiperplazia stratului bazal (sunt produse mai multe celule decât cele care se pierd). Celulele care produc MCV sunt hipokeratinizate, dovada unui proces de diferenţiere anormală. Leziunea este delimitată de o capsulă conjunctivă. Histologic, leziunea MCV conţine conglomerate de celule epiteliale hiperplazice într-o indentaţie centrală, organizate în foliculi, în care se multiplică virusul. Întreaga leziune are aspectul unui folicul pilos, în care părul este înlocuit de conglomeratul celular.

În leziunile MC lipsesc efectorii imunitari, în special macrofagele specifice ţesutului tegumentar (celulele Langerhans). Absenţa efectorilor imunitari se datorează sintezei unui factor codificat de virus care blochează imigrarea neutrofilelor şi a moleculelor omologe CMH I, care blochează prezentarea antigenelor virale şi o fac nedetectabilă antigenic.

Virusul MC nu a fost cultivat, dar induce ECP specific în fibroblastele umane primare şi în cele imortalizate. ECP devine evident după 4 ore şi atinge intensitatea maximă la 24 de ore: o proporţie semnificativă a celulelor se detaşează din monostrat, se rotunjesc şi se agregă. La 48–72 ore de la infecţie, celulele aderă de substrat, dar şi-au pierdut morfologia caracteristică şi dobândesc aspectul epitelioid. ECP nu este indus în celulele tratate cu cicloheximidă (un antibiotic inhibitor al sintezei proteinelor – inhibă alungirea catenei polipeptidice) şi nici de preparatul MCV inactivat prin iradiere, ceea ce denotă că MCV transcrie ARNm timpuriu.

Bibliografie

Bugert J. J. 2008. *Molluscum Contagiosum* virus, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Baxby D. 1990. *Poxviruses*, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Moss B. 1990. *Poxviridae* and Their Replication, în vol. Virology, Sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Fenner F. 1990. *Poxviruses*, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Moss B. *Poxviridae:* The Viruses and Their Replication, în vol. Fields Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.

Buller R. M., Palumbo G. J. 1991. Poxvirus pathogenesis – Microbiol. Rev., 1991, 55 (1) : 80–122.

Mihăescu Gr. 1985. Inhibition of some deoxyriboviruses replication cycle in tannic acid pretreated cells. Rev. Roum. Biol. 30, 2, 175–179.

Mihăescu Gr., Mişcalencu D., Ionescu M. D. 1980. Ultrastructural aspects of *vaccinia* virus morphogenesis in L-23 line cells. Rev. Roum. Biol. 25, 1, 69–73.

Mihăescu Gr., Gavrilă L.1988. A *poxvirus* in salivary glands of *Chironomus plumosus*. Rev. Roum. Biol. 33, 1, 15–20.

21.17. Familia Hepadnaviridae

Familia *Hepadnaviridae* cuprinde *virusul hepatitei B*, infecţios pentru om, virusul hepatitei marmotei (*Monax monax*), virusul hepatitei veveriţei *Spermophilus beecheyi* şi virusul hepatitei B la raţa de Pekin. Hepadnavirusurile mamaliene şi cele aviare prezintă diferenţe mari de ordin genetic şi probabil sunt două grupe sau două genuri distincte.

Trăsături comune:

- au un *înveliş proteic*, care înconjură o nucleocapsidă electronodensă, sferică, ale cărei capsomere sunt probabil aşezate după modelul simetriei icozaedrice;
- genomul lor este o *moleculă de ADN* cu dimensiuni asemănătoare;
- au un mecanism unic al replicării ADN, care implică transcrierea inversă a unui ARN viral;
- toate au un *spectru de gazdă foarte îngust* şi un *tropism* foarte evident pentru hepatocite;
- hepatocitele infectate produc şi elimină *cantităţi mari de înveliş viral* neinfecţios, precum şi virioni infecţioşi, până la 500 μg/ml sânge;
- produc infecţii *persistente*, cu viremie ce durează ani de zile, cu efecte citopatice limitate sau absente şi fără leziuni hepatice;
- infecţiile pot fi asociate cu *hepatita acută şi cronică*, cu *carcinom hepatocelular*, dar datorită persistenţei infecţiei şi producerii antigenelor în mare exces, infecţia se poate asocia cu *maladii mediate de complexele imune*;
- *genomul se poate integra în ADN* celular şi infecţia poate rămâne latentă.

Hepadnavirusurile au rol helper pentru VHD, căruia îi furnizează polipeptidele de înveliş.

Structura (fig. 430). Virionii hepatitei B (VHB) au formă sferică, cu diametrul de 42–47 nm. Genomul împreună cu capsida, formează *nucleocapsida* electrono-densă, cu diametrul de 25 nm, acoperită de *învelişul extern,* gros de 7 nm, cu o compoziţie chimică diferită de a peplosului celorlalte virusuri.

Învelişul extern al virionilor constă din circa 240 subunităţi, cu o distribuţie ordonată şi conţine trei *proteine* diferite: *LHBs (L*arge), *MHBs* (*M*iddle) şi *SHBs* (*S*mall). Toate formează *antigenul de suprafaţă* al virusului (AgHBs), faţă de care se sintetizează anticorpi neutralizanţi. I se atribuie denumirea de "înveliş", dar este de natură *proteică.*

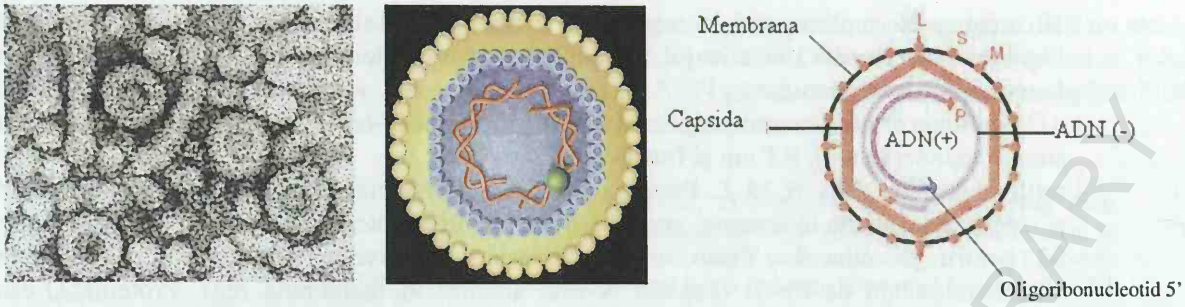


Fig. 430. a. Morfologia particulelor VHB la microscopul electronic pe preparatul colorat negativ: virioni maturi Dane cu diam. de 42 nm, particule filamentoase şi sferice pleomorfe de 20–22 nm, forme ale antigenului HBs (după Harrison şi colab., 2004). b. Reprezentarea schematică a componentelor structurale ale VHB. c. Organizarea genomului VHB.

Toate cele 3 proteine de înveliş conţin *proteina SHBs*, componenta antigenică a învelişului viral: proteina LHBs este alcătuită din subunităţile pre-S_1, pre-S_2 şi S; MHBs conţine subunităţile pre-S_1 şi S, iar SHBs este formată numai din subunitatea S.

Capsida este alcătuită din capsomere identice, care conţin proteina HBc (core), alcătuită la rândul ei, din două subunităţi identice.

Particula virală care conţine regiunea centrală electrono-densă (nucleocapsida), acoperită de înveliş, poartă denumirea de *particula Dane* (1970) şi reprezintă *virionul complet.* Regiunea centrală a virionului se poate elibera sub acţiunea unui detergent neionic (SDS) şi este alcătuită din *Ag HBc* (core) şi *Ag HBe* (endogen), ADN, ADN-pol şi o *protein-kinază.* HBe se găseşte şi în ser ca Ag solubil.

În serul pacienţilor şi al purtătorilor se găsesc alte două tipuri de structuri;

– *unele sferice*, cu diametrul de 15–20 nm, în mare exces cantitativ, adesea fiind singurele structuri în serul purtătorilor;

– altele *lungi*, chiar filamentoase, cu grosimea de 20 nm şi lungimea de până la 200 nm.

Atât cele sferice mici, cât şi cele alungite sunt *particule incomplete*, lipsite de genom. Ele conţin numai proteinele de înveliş, asociate cu lipide: cele sferice conţin numai molecule SHBs şi MHBs, iar cele lungi posedă toate cele trei proteine (LHBs, MHBs, SHBs), componente ale AgHBs. Antigenul HBs s-a numit *antigen Australia* pentru că s-a descoperit în serul unui tânăr aborigen (Blumberg, 1965).

Densitatea virionilor compleţi în serul pacienţilor poate depăşi 10^9 particule/ml, dar împreună cu celelalte forme particulate, în special cele sferice, se realizează densităţi de 10^{13}/ml. Serul pacienţilor (sau al purtătorilor) este infecţios pentru cimpanzeu la diluţii de 10^{-7}–10^{-8}, sau chiar mai mari. Alteori, chiar nediluat, serul nu este infecţios, deoarece lipsesc virionii compleţi. Serurile neinfecţioase conţin numai structurile sferice mici (mai puţin cele filamentoase), cu antigenul HBs.

Virionii infecţioşi trec prin filtrul Seitz, cu pori de 52 nm.

Virionii compleţi sunt rezistenţi la eter, la fenol 0,25% şi îşi păstrează infecţiozitatea după încălzirea la 60° timp de 4 ore, sau după menţinerea la temperaturi scăzute.

Genomul. Hepadnavirusurile au cel mai mic genom ADN, reprezentat de o moleculă de ADN, *parţial dublu catenară*: o catenă completă, de polaritate *negativă,* a cărei secvenţă este complementară faţă de ARNm şi conţine 3000–3300 nucleotide. Catena este deschisă, adică extremităţile sunt libere. La capătul 5' este legat covalent un *polipeptid*, cu rol de *primer* (P) pentru sinteza acestei catene. Din această cauză, capătul 5' nu poate fi fosforilat de polinucleotid-kinază.

Cea de a II-a catenă, de *polaritate pozitivă*, este incompletă şi are o lungime variabilă, între 1100–2600 nucleotide. Pentru sinteza catenei scurte, rolul de primer revine unui *oligoribonucleotid*, de 11–12 nucleotide, legat la capătul 5' al catenei pozitive şi reprezintă capătul 5' al ARN pregenomic, care rămâne nedegradat. La capătul 3' este legată covalent o moleculă de RT (proteina p).

Genomul cu o lungime de 3 kbp, este organizat în *patru cadre* de citire (ORF), parţial suprapuse, toate pe catena completă (negativă), codifică un set de 7 proteine:

– proteina regiunii centrale (*HBc*);

– în sângele unor pacienţi se găsesc nu numai particulele virale complete sau incomplete, dar şi un antigen solubil, *HBe*, *peptidul semnal* al proteinei *HBc,* asemănătoare proteinei C, cu

10 aminoacizi suplimentari la capătul N şi mai scurtă cu 34 aminoacizi la capătul C. Peptidul *HBe* rezultă din clivajul proteolitic al unei proteine precursoare a lui *HBc,* dar funcţia sa nu este cunoscută;

- *ADN-polimeraza* (reverstranscriptaza), al cărei domeniu N-terminal are rol de *primer* pentru sinteza catenei întregi. RT are şi funcţie de RN-ază H;
- setul de proteine *HBs*: S, M, L. Proteina S are 226 aminoacizi, iar celelalte conţin secvenţa S şi secvenţele situate în amonte: pre-S2 (189 nt) pentru proteina M şi pre-S1 (489 nt) şi pre-S2 pentru proteina L. Toate cele 3 proteine de înveliş sunt proteine glicozilate, transmembranare de tip II (capătul N este ancorat în membrana reg). Proteina L este esterificată cu un rest de *acid miristic* la capătul N, necesar infecţiozităţii virale (C. Seeger, 2000). Cadrul de citire al genei S are 3 codoni de iniţiere şi se sintetizează proteinele L, M şi S (L = pre-S1 + pre-S2 + S; M = pre S_2 + S). Particulele Dane conţin toate cele 3 tipuri de proteine. Particulele sferice şi filamentoase, care se acumulează în ser la concentraţii de *câteva sute de micrograme/ml*, conţin o proporţie foarte mare a proteinei S;
- proteina *HBx* (evidenţiată prin prezenţa Ac specifici în serul pacienţilor) este esenţială pentru multiplicarea HBV în organismul gazdă. Rolul ei constă în *activarea indirectă a transcrierii* unor gene celulare, inclusiv a genelor CMH, deoarece stimulează transducerea semnalului. Pentru că nu se asociază cu ADN celular, nu este un transactivator tipic.

Ciclul de multiplicare

VHB nu se multiplică în liniile celulare, dar unele linii pot fi infectate cu ADN de HBV (transfecţie) şi cu VHB al raţei de Pekin. Rezultatele s-au completat cu studii pe ţesutul hepatic uman infectat recoltat prin biopsie.

Receptorii hepatocitului pentru HBV nu s-au identificat. VHB se ataşează prin proteina L, este endocitat şi este eliberat prin fuziunea învelişului proteic cu membrana endosomului. Nucleocapsida este transportată prin porii membranei nucleare, în nucleu, sau capsida se dezagregă la contactul cu proteinele porilor şi în nucleu este transportat genomul nud. Ciclul multiplicării hepadnavirusurilor este *nucleo-citoplasmatic*. Genomul ADN este convertit la ADN dc circular închis, detectabil în nucleul celulei. Conversia ADN genomic circular-relaxat, la ADN circular covalent închis, presupune următoarele modificări:

- *completarea prin sinteză*, a catenei incomplete de ADN genomic (de polaritate pozitivă), catalizată de *ADN-polimeraza virală*, ataşată la capătul 3' al acestei catene;
- *îndepărtarea primerilor de la capetele 5' ale celor două catene: proteina 5' a* catenei complete (de polaritate negativă) şi a *oligoribonucleotidului* de la capătul 5' al catenei de polaritate pozitivă;
- scurtarea catenei complete (–), prin îndepărtarea capătului 5' ce determină regiunea tricatenară;
- *legarea capetelor* celor două catene şi formarea unei molecule dublu catenare închisă covalent. Probabil că aceste etape sunt catalizate de enzime ale celulei. ADN viral nu este replicat în nucleu, chiar dacă mai multe copii genomice ajung ulterior în nucleu.

Genomul dublu catenar, covalent închis, are două posibilităţi de evoluţie:

- cu frecvenţă mică *se integrează* într-un cromosom al celulei şi catena de polaritate negativă este transcrisă de ARN-polimeraza II celulară, în ARN-pregenomic;
- este substratul *transcrierii*: catena de polaritate negativă este transcrisă de ARN-polimeraza II a celulei, în două tipuri de ARN: *ARN pregenomic* (3,5 kb) şi *ARNm monocistronic,* al celor 4 cadre de citire (S, C, P, X) pentru sinteza *proteinelor structurale* majore ale virionului. Toate copiile de ARN sunt bonetate la capătul 5' şi poliadenilate la capătul 3' (fig. 431a).

ARN pregenomic de 3,5 kb este mai lung decât catena genomică (3,2 kb), pentru că o parte a genomului (DR1) este transcrisă de două ori (DR2 şi DR1), astfel că moleculele au secvenţe terminale directe (fig. 431a).

Moleculele de ARN (pregenomic şi mesagere) sunt transportate în citoplasmă. Aici RT se asociază cu o secvenţă de tip *peduncul-buclă* (ε) la capătul 5'al ARN pregenomic şi cu *primerul polipeptidic* (fig. 431b). Pe matriţa de ARN pregenomic (pg), RT catalizează sinteza catenei complete

de *polaritate negativă.* Domeniul N-terminal al proteinei cu rol de primer polipeptidic oferă un rest – *OH al tirozinei* pentru a forma o legătură fosfodiesterică cu dGMP. După sinteza a 4 nucleotide, rolul de primer al proteinei se încheie, deoarece molecula de ADN nascentă este transferată la capătul 3' al ARN pregenomic, unde cele 4 nt se împerechează cu baze complementare.

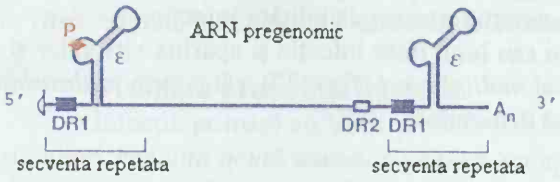


Fig. 431a. ARN pregenomic este mai lung decât molecula genomică de ADN. La cele două capete se găsesc secvențele peduncul-buclă (ε). P = RT asociată secvenței buclă-peduncul. Domeniul N-terminal al RT (sau un alt polipeptid) are rol de primer pentru sinteza ADN; DR_2 = secvența suplimentară repetată a DR_1.

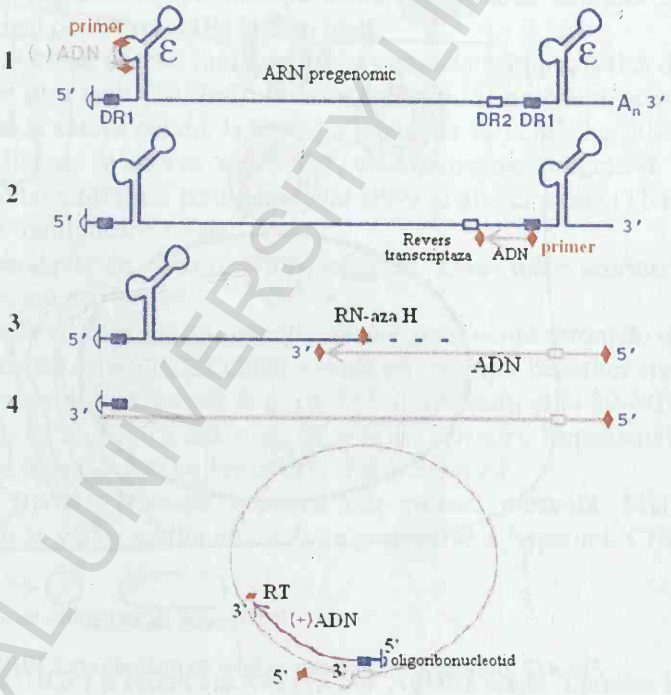


Fig. 431b. Ilustrarea schematică a mecanismului molecular al replicării ADN-HBV. RT se asociază cu secvența buclă-peduncul a ARN pregenomic. Un polipeptid are rolul de primer. După sinteza primelor 4 dezoxiribonucleotide, molecula de ADN nascentă, asociată cu polipeptidul primer la capătul 5', sare la capătul opus al matriței de ARN pregenomic și se continuă sinteza catenei întregi. Pe măsură ce progresează sinteza catenei de ADN, matrița de ARN pregenomic este hidrolizată sub acțiunea RN-azei H, activitate asociată RT. Pe catena de ADN se sintetizează cea de a II-a catenă, cu un primer de circa 20 de ribonucleotide (culoare albastră la capătul 5') din molecula de ARN pregenomic. Molecula genomică este formată dintr-o catenă completă, la al cărei capăt 5' este asociată proteina cu rol de primer, și o catenă incompletă la al cărei capăt 5' este asociat oligo-ribonucleotidul cu rol de primer, iar la capătul 3' este RT (după *John B. Carter* and *Venetia A. Saunders*, 2007).

Sinteza *catenei incomplete, de polaritate negativă*, implică de asemenea o etapă de transfer. Oligomerul ARN de la capătul 3' al ADN este, probabil, un rest al ARN pregenomic rezultat după hidroliză. Rezultatul final al reverstranscrierii este un ADN *relaxat circular* (ADN dc), cu capetele 5' modificate. Circa 10% din totalul virionilor Dane au ADN dc linear.

Moleculele HBs se ancorează cu capătul N-terminal, în membranele r e g.

Molecula de ADN se asociază cu *proteina majoră* (HBc) și se formează *nucleocapside.* Asamblarea acestora este reglată de cantitatea de proteine HBs. Când cantitatea proteinelor de înveliș este mică, nucleocapsidele pot migra spre *membrana nucleară*, se dezagregă și eliberează genomul ADN nascent, în nucleul hepatocitului. Genomul se maturează în ADN dublu catenar circular și este transcris în ARN pregenomic și ARN mesageri. Astfel se restabilește cantitatea de genomuri virale (10–50 copii) în nucleu, necesare sintezei proteinelor.

După sinteza proteinelor HBs, nucleocapsidele sunt orientate pe calea secretorie a celulei: în citoplasmă sunt translocate prin înmugurire în lumenul r e g, proces în care sunt *învelite* cu toate cele 3 variante de proteine HBs *inserate* în membranele r e g. Particulele virale urmează calea secretorie a celulei: sunt transferate în cisternele Golgi unde proteina S se maturează prin *glicozilare și acilare* (cu acidul miristic). Particulele complete și incomplete sunt transportate, probabil în vezicule, care fuzionează cu membrana plasmatică și eliberează virionii prin exocitoză la polul vascular al hepatocitului, în torentul sanguin.

Hepatocitul infectat rămâne viabil luni de zile și eliberează cantități mari de virion și particule neinfecțioase. În liniile celulare infectate productiv nu se observă ECP.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Proteinele componente ale învelişului viral (HBs) se sintetizează în mare exces, ele fiind astfel, atât *proteine structurale*, cât şi *nestructurale*. Excesul de proteine HBs nestructurale din sânge are o semnificaţie profundă prin efectele sale:

– *blochează receptorii* specifici ai limfocitelor şi induce *starea de toleranţă* în stadiile tardive ale infecţiei persistente, ca o condiţie necesară pentru infecţia persistentă;
– realizează un *nivel crescut al viremiei*, ca o condiţie a transmisibilităţii infecţiei.

Perioada lungă de incubaţie (câteva saptămâni sau luni, între infecţie şi apariţia virionilor şi a proteinei HBs) s-ar putea explica atât prin *ritmul lent al multiplicării* (fig. 432), cât şi prin *reabsorbţia* imediată a virionilor progeni pe receptorii celulari, încă disponibili.

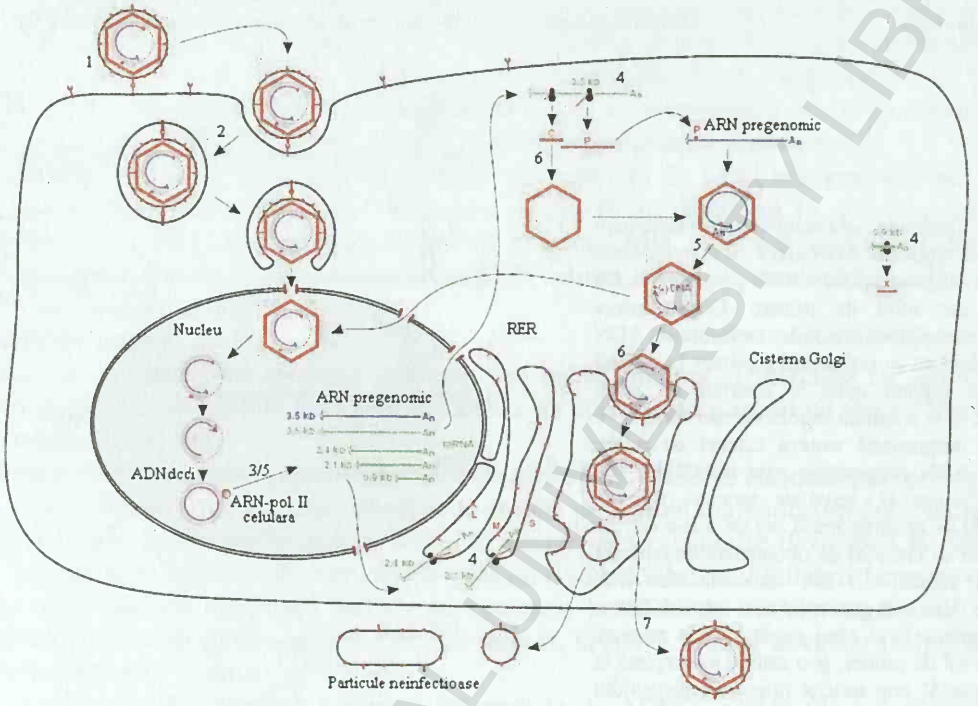


Fig. 432. Ilustrarea schematică a ciclului de multiplicare a VHB. Amănunte în text (după Carter şi Saunders, 2007).

Proteina HBe se găseşte în sângele purtătorilor înalt producători. Sinteza ei este codificată de ARN care conţine atât gena pentru *proteina HBc*, cât şi o secvenţă "pre c" care codifică *peptidul semnal*, ce orientează peptidul HBc nascent, spre membranele reticulului endoplasmic şi determină *translocaţia HBc în lumen*. Translocaţia HBc în cisternele r e g este incompletă şi permite unei părţi a moleculelor sale să reintre în citosol şi posibil chiar în nucleu. Cea mai mare parte a HBe este clivată la nivelul reticulului sau al cisternelor Golgi şi rezultă proteina de 16–18 kDa din ser.

Virusul hepatitei B umane se poate elibera din celulă în orice moment după asamblarea citoplasmatică, deoarece în sânge se găsesc virioni cu genom hibrid ADN-ARN sau virioni care conţin numai catena ADN de polaritate negativă (genom monocatenar).

ADN viral se replică printr-un mecanism neobişnuit, care implică *transcrierea inversă* a unei copii de ARN pregenomic, mecanism considerat anterior ca fiind unic pentru retravirusuri. De aceea se consideră că Hepadna- ar avea origine comună cu a retravirusurilor, deoarece genomul lor se replică printr-un intermediar. Deosebirea este că Hepadna- împachetează ADN, iar rolul de primer pentru sinteza catenei negative îl are domeniul N-terminal al RT (la retravirusuri, rolul de primer îl are ARNt).

Integrarea nu face parte din ciclul de multiplicare a hepadnavirusurilor, iar ADN-polimeraza virală nu are un situs cu activitate de integrază (spre deosebire de cea retravirală). Totuşi, integrarea ADN viral este un eveniment relativ *frecvent*. ADN viral în stare integrată s-a evidenţiat prin tehnica *hibridării in situ*, în hepatocitele netransformate, în hepatocitele neoplazice umane (CHC) şi ale raţei de Pekin, în liniile celulare derivate din CHC. Secvenţa integrată are dimensiuni *subgenomice*. Integrarea este lipsită de specificitate pentru că are loc în mai mulţi cromosomi.

BAUMAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ADN de HBV integrat este adeseori format din două sau mai multe fragmente, legate cap-coadă sau în alte succesiuni.

După integrarea genomului viral într-un cromosom al celulei hepatice, infecția devine *persistentă* și se sintetizează antigene virale. Integrarea destabilizează genomul gazdei, prin acțiune directă sau este mediată de efectul proteinei HBx asupra antioncogenei p53. Liniile celulare maligne, *in vitro,* elimină particule cu diametrul de 20 nm.

Dinamica procesului infecțios

Infecția primară cu VHB produce, de cele mai multe ori, la tineri și adulți, infecții *inaparente* și rareori *hepatita acută* tranzitorie tipică, cu apariția HBs în sânge, care precede cu 2 sau mai multe săptămâni, modificarea testelor biochimice hepatice. După infecția acută, majoritatea adulților *se sterilizează* în câteva luni. Virusul este eliminat de Ac anti-HBs la titru înalt.

Infecțiile tranzitorii au o durată de evoluție de 1–6 luni, incluzând perioada asimptomatică de incubare, dar poate fi asociată cu viremie la titru înalt (10^{10}/ml). În acest interval, SI nu reacționează sau nu este activat și infecția progresează de la câteva celule, la întreaga populație de celule hepatice. După activarea RI, virusul este eliminat din ser în câteva săptămâni, cu diminuarea progresivă a celulelor infectate. Se presupune că hepatocitele infectate sunt lizate, dar IFNγ și alte citokine (TNF) pot avea rol esențial în stoparea necitocidă a multiplicării virale.

Severitatea infecției acute este dependentă de *doza* de virus infectant. Doza mare scurtează perioada de incubație și produce o hepatită acută mai severă.

La cei care sintetzează Ac anti HBs la un titru scăzut, *infecția devine persistentă* (cronică) *de tip productiv. Persistența* Ag HBs mai mult de 6 luni de la debut semnifică evoluția hepatitei spre *cronicizare*, cu severitate variabilă. *Hepatita* evoluează *cronic* la circa 5% dintre adulți și la 80–90% dintre copiii infectați perinatal acut. Pacienții nu se sterilizează, ci devin purtători *cronici*. Hepatocitele continuă să producă virus. Clinic, persistența este asociată cu *hepatita cronică viremică.*

Titrul viral este mai mare de 1 μg/ml*. Necroza hepatică este rareori prezentă. Mulți dintre pacienții cu hepatită cronică, infectați la vârsta adultă au evoluție progresivă a hepatitei: CHC sau ciroză.

* Trusele comerciale detectează cantități mici, de ordinul ng de Ag viral/ml.

Hepatita cronică poate fi *persistentă* (HCP) și cronică activă (HCA). AgHBs poate fi produs la titru foarte înalt, deși multiplicarea virală propriu-zisă (producerea virusului progen) este blocată, iar evoluția procesului patologic este favorabilă: lipsește infiltrarea leucocitară. Explicația sintezei AgHBs în absența multiplicării virale detectabile este că *ADN viral se integrează* într-un cromosom al celulei. Din provirusul integrat este transcris numai ARNm pentru HBs, iar secvențele pentru ARNm *pol* și pentru *proteina c* sunt represate. Pe de altă parte, ADN integrat poate fi rearanjat, înainte sau după integrare. Indivizii cu titru viremic înalt (10^9–10^{10}/ml) au RI de mică intensitate, iar procesul patologic este atenuat și invers, cei cu titru antigenic mai mic (10^7–10^8) au proces patologic mai intens.

La pacienții cu *hepatită cronică activă* (HCA) se asamblează virus complet și în ser se evidențiază HBe. În serul pacienților se detectează Ac anti-HBc și anti-HBe.

Infecția cronică prezintă un risc crescut de *evoluție cirotică** sau *CHC.*

* *Ciroza* este o fibroză hepatică ireversibilă și se caracterizează prin apariția nodulilor regenerativi, formați din hepatocite și fibroză difuză. Dimensiunile nodulilor cresc odată cu progresia cirozei. Rata progresiei este foarte variabilă. În faza cirotică fluxul sanguin este alterat: crește tensiunea portală și apar varice esofagiene. Sinteza proteinelor hepatice și metabolismul intermediar sunt alterate sever. Creșterea tensiunii portale favorizează acumularea lichidului ascitic în cavitatea abdominală. Ciroza este un risc major pentru dezvoltarea CHC.

Peste 300 de milioane de persoane sunt infectate persistent cronic. Infecția cronică este asociată cu leziuni de diferite grade, de la cele foarte ușoare, până la cele severe.

Deși s-a considerat că VHB este strict *hepatotrop*, ADN, ARN și Ag virale s-au găsit în celulele epiteliale ale ductelor biliare, în pancreas, rinichi, cortexul suprarenalelor, tegument, macrofage, splină, măduva osoasă.

O mică proporție a *limfocitelor B* infectate latent, devin permisive pentru multiplicarea virală. Virionii progeni reinfectează celulele epiteliale ale orofaringelui şi astfel virusul se propagă în populația umană. În infecția cronică a epiteliului nazofaringian, virusul este protejat de sistemul imunitar, datorită inaccesibilității limfocitelor T.

Variabilitatea antigenică. Izolatele de VHB au fost tipizate serologic pe baza reactivității Ag HBs. HBV umane cuprind 6 *genotipuri*: A --- F, care diferă prin 8–15% din secvența de nt. Existența genelor suprapuse împiedică variabilitatea excesivă.

Mutantele HBV sunt consecința erorilor de replicare a genomului. Deoarece infecția umană cu HBV durează mai mulți ani sau decade, schimbările bazelor se acumulează şi produc mutante. Toate variantele au un determinant comun localizat pe proteina S de 226 aminoacizi, în secvența 111–156.

Patogeneză

Mecanismul producerii leziunilor hepatice este incert. HBV nu pare a avea ECP direct asupra hepatocitului. Apariția HBs în sânge nu este asociată cu ECP, ceea ce se corelează cu absența hepatitei clinice la purtătorii care produc numai HBs. Totuşi, acumularea excesivă a Ag HBs în hepatocite poate produce citoliza.

Maladia inflamatorie a ficatului este cauzată de RI al gazdei față de Ag virale. RI anti-HBV este viguros, policlonal şi multispecific, pentru toate proteinele virale, la pacienții care se sterilizează şi mai puțin intens la pacienții infectați cronic, care nu se pot steriliza.

Celulele Kupffer din pereții capilarelor sinusoide au rolul de CPA şi prezintă Ag virale HBc şi HBs în asociație cu moleculele CMH II. Informația antigenică este preluată de limfocitele TCD_4. Acestea secretă citokine (IL-2, IFNγ, TNFα) stimulatoare ale RIMC sau citokine (IL-4, IL-10) stimulatoare ale RIMH. Limfocitele B se diferențiază şi sintetizează Ac anti HBs neutralizanți ai virionilor, iar limfocitele Tc recunosc epitopii virali expuşi pe membrana hepatocitului în asociație cu moleculele CMH I şi exercită efect citolitic față de hepatocite sau inhibă multiplicarea VHB, fără liza hepatocitului. Multe celule sunt lizate înainte de a elibera virus.

Anticorpii elimină virionii liberi, iar IMC elimină celulele infectate. Diseminarea virusului la alte celule sensibile este controlată de Ac specifici neutralizanți. Protecția locală este de asemenea conferită de IFN şi de alte citokine, care pot induce rezistența celulelor învecinate celor infectate.

Reactivitatea IMC în faza acută este decisivă pentru evoluția infecției: organismul se sterilizează sau infecția se cronicizează.

In vitro, limfocitele circulante ale pacienților cu hepatită B au efect citotoxic față de hepatocitele autologe. Efectul citotoxic este blocat de Ac anti-HBc, ceea ce sugerează că Ag HBc este expus pe suprafața hepatocitelor şi poate fi ținta limfocitelor Tc. HBc poate fi toxic pentru celulă, probabil datorită asocierii sale cu ADN.

Patogeneza infecției cu VHB este nu numai directă, consecință a infecției, ci este şi *secundară*: complexele imune se depun în special în glomerulii renali, unde inițiază procese inflamatorii cu efect distructiv.

Hepatita acută constă în necroza multifocală a celulelor parenchimatoase şi inflamație periportală histiocitară. Rețeaua de reticulină a ficatului este bine păstrată, cu excepția cazurilor de necroză masivă. Celulele hepatice arată modificări necrotice de intensitate diferită, în special în aria centrolobulară. Necroza tinde frecvent să fie zonală. Celulele hepatice moarte sau care mor sunt extruzate în spațiul perisinusoidal. Celulele Kupffer şi celulele endoteliale proliferează şi adeseori conțin lipofuscină (un pigment degenerativ).

Circa 0,2% dintre cazurile clinice de hepatită acută sunt foarte severe, cu insuficiență hepatică gravă în câteva zile, comă hepatică, adeseori fatală. Supraviețuitorii se recuperează complet şi devin imuni la HBs şi HBc. Cazurile fulminante sunt adeseori asociate cu infecția cu HDV sau cu alte virusuri hepatitice, cu epurarea rapidă a Ag HBs şi HBe şi depunerea în rinichi, producând insuficiența renală, la care se adaugă leziunile ample pe care le produce RIMC excesiv de intens. În contrast, pacienții imunocompromişi fac o hepatită subclinică asociată cu persistența virală.

Hepatita B acută şi cronică, histologic se caracterizează prin *infiltrare limfocitară* (în special cu limfocite Tc), reacție inflamatorie, liza hepatocitelor urmată de regenerare. Limfocitele Tc stimulează celulele inflamatorii nespecifice: PMNN, monocite. Se eliberează citokine care mențin şi

RUSF CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

amplifică focarul inflamator. Rezultatul răspunsului inflamator este moartea *apoptotică* a hepatocitelor indusă de citokine sau moartea *necrotică*. Rata fiziologică a reînnoirii hepatocitelor este de 6–12 luni, iar la pacienții infectați cu HBV, rata regenerării este de câteva ori mai mare.

Teste biochimice ale funcției hepatice. Nivelul seric al ALT, AST și al altor enzime eliberate de celulele hepatice se corelează direct cu numărul celulelor lezate și este mai înalt la pacienții cu hepatita acută. Valoarea bilirubinei în urină este mai mare. Nivelul bilirubinei libere și conjugate în ser crește.

Numărul leucocitelor sanguine este normal.

Epidemiologie

Hepatita B este o problemă majoră de sănătate publică. *Un milion* de oameni mor anual de hepatita cronică B și sechele.

Circa 50% din populația globului are experiența contactului antigenic cu HBV și circa 10% este infectată *persistent*, adică sunt purtători de virus. VHB s-a găsit chiar în sângele unor indivizi care nu au prezentat niciodată semne clinice de infecție, dar pot să fie purtători viremici timp de ani de zile.

Circa 10% dintre adulții infectați și peste 90% dintre copiii născuți de mame HBe pozitive devin purtători cronici. Examenul biopsiei relevă semnele HCA. În contrast, purtătorii pozitivi pentru HBs, care nu au avut hepatită clinică, au în special HCP sau histologia hepatică este normală. Acești purtători au fost, probabil, infectați în perioada neonatală, când este indusă starea de toleranță față de Ag HBs datorită imaturității sistemului imunitar.

Purtătorii au un risc de 223 de ori mai mare de ciroză hepatică și de 100 de ori mai mare de a face CHC.

Virusul poate produce hepatita serică numai după inocularea parenterală.

Transmiterea VHB se face prin sângele contaminat și derivatele lui, prin folosirea acelor și seringilor contaminate, transplacentar (dacă sângele matern are titru viral înalt), dar și perinatal (în timpul expulziei fetale) și chiar prin lichidul spermatic. Transmiterea cea mai eficace este prin contactul virusului cu mucoasele. Tegumentul intact este impermeabil, dar virusul poate pătrunde prin rănile deschise.

Dacă titrul infecțios este foarte mare (10^8 particule/ml ser), cantități foarte mici de ser sau ale diferitelor secreții (salivă, lichid spermatic, secreție vaginală, sânge menstrual) pot transmite infecția cu VHB. În absența particulelor virale complete, fluidele nu sunt infecțioase.

Dacă serul unui purtător de VHB are un titru infecțios de 10^9 particule/ml, *1 nl* (o cantitate invizibilă) conține 100 doze infecțioase și transmite infecția prin seringă.

VHB nu se găsește în scaun și nu este infecțios după administrare orală.

Contactul heterosexual este o cale relativ eficientă de transmitere. Transmiterea este mai frecventă între bărbații homosexuali. Muşcătura este o cale eficientă de transmitere, dar sărutul este inofensiv.

La titruri infecțioase $<10^6$ pv infecțioase/ml, transmiterea se face numai prin seringa contaminată. La acest titru, virusul nu străbate bariera placentară. De la mama infectată persistent, la naștere virusul trece la nou-născut odată cu ruperea vaselor de sânge ale placentei sau prin secreția lactată. Copiii infectați perinatal sunt imunotoleranți la antigenele virale și au un risc de circa 90% de a face o infecție persistentă pentru toată viața. În regiunile cu endemism înalt (peste 8% dintre indivizi sunt infectați persistent), virusul se menține prin transmiterea de la mamă la făt.

Contactul școlar sau profesional nu prezintă risc de transmitere, chiar la titru înalt. Nu se transmite prin ciclul fecal-oral.

Perioada de incubație este de 45–160 de zile. Simptomele sunt nespecifice: vomă, anorexie, senzație de oboseală, mialgie, apatie, stare de rău general și sunt urmate uneori de *icter*. Rareori, icterul apare fără perioada prodromală.

HBV produce ECP minim și, la indivizii imunotoleranți, virusul este produs în cantitate mare pentru perioade lungi, dar leziunile hepatice sunt minime. Multiplicarea virusului mărește riscul integrării ADN viral și implicit al transformării neoplazice.

Persoanele care au avut hepatită nu vor dona sânge, deși virusul se poate găsi chiar la persoanele clinic sănătoase.

BCU CLUJ - UNIVERSITATEA LIBRARY

Depozitarea prelungită a plasmei (câteva luni) la temperatura camerei diminuează riscul infecției: 0,01 ml plasmă infectată, poate transmite infecția. De aceea, în amestecul de plasmă, un singur purtător poate infecta o cantitate foarte mare de plasmă.

Vaccinare. HBs purificat de la purtători și inactivat cu pepsină, uree, formol, se folosește ca vaccin.

Vaccinul cu *HBs* obținut prin *inginerie genică* (gena se clonează în celulele de levuri sau în celule mamaliene) a conferit protecție față de infecție. Doza standard este de 10–20 μg, adsorbită pe hidroxid de Al (ajuvant) și o substanță antibacteriană. De obicei, la adulți se aplică 3 doze: a II-a, la o lună după prima și a III-a, la 6 luni.

Diagnosticul VHB se bazează pe *creșterea nivelului ALT.* Valorile sale cresc de la limita superioară normală de 22 UI/L pentru bărbați și de 18 UI/L la femei, la 25°, la 300 UI/L – până la *câteva mii UI/L* în cazurile severe.

Nivelul ALT indică gradul leziunilor hepatocitelor, crește brusc la sfârșitul fazei prodromale și atinge valoarea maximă cu puțin înainte de apariția icterului. În infecția cronică, nivelul ALT crește moderat.

Cel mai evident marker serologic al hepatitei B acute este *IgM crescut*, anti-HBc. Diagnosticul infecției în *faza acută* este confirmat prin detectarea antigenului HBs sau prin evidențierea titrului crescut al Ac anti-HBc: IgM anti-HBc se sintetizează timpuriu și este un marker sigur al infecției acute curente, iar IgG anti-HBc indică o infecție anterioară.

Deoarece este asociat cu HBc și cu ADN, *evidențierea HBe* este un test fidel al infecțiozității sângelui.

Pacienții cu HBs persistent în ser pentru mai mult de 6 luni sunt purtători, de risc înalt sau scăzut, în funcție de prezența, respectiv absența Ag HBe.

Existența HBc pe celulele hepatice și a HBe seric este indiciu pentru o hepatită activă. Sinteza lor este asociată cu creșterea titrului Ac specifici.

Recuperarea totală este marcată de scăderea ALT la valori normale și negativarea pentru Ag HBs.

Scopul terapiei este reducerea nivelului viremiei și ameliorarea funcției hepatice. Tratamentul se bazează pe *IFNα* și *lamuvidină.* IFNα administrat mai mult de 3 luni este eficace pentru 30% dintre pacienții cu infecție cronică. Pacienții cu concentrații mici de ADN viral în ser răspund mult mai bine decât cei cu concentrații înalte. Remisiunile sunt de lungă durată, asociate cu pierderea Ag HBe și HBs.

Lamuvidina, un analog nucleozidic, inhibă RT virală și a înlocuit IFNα ca medicament de primă linie, deoarece este mai sigur. Administrată timp de 12 luni, scade concentrația de ADN viral, ameliorează histologia ficatului, deoarece, ca și ribavirina administrată pentru tratamentul hepatitei cu virus C, pare să aibă efect imunosupresor (C. Seeger, 2000), iar enzimele hepatice revin la valori normale. După administrare de circa 1 an, variantele rezistente la lamuvidină refac populația de virioni.

Neoplazia hepatică. Riscul de neoplazie la persoanele infectate cronic cu HBV este de 10–25%. ADN viral integrat în tumori are, probabil, un rol direct în oncogeneză, dar 20% din totalul tumorilor CHC de la purtătorii Ag HBs sunt negative pentru ADN viral, ceea ce sugerează că în oncogeneză sunt implicate alte mecanisme. Integrarea ADN viral în ADN celular este aleatorie, fără secvențe specifice.

ADN viral integrat poate fi detectat în ficatul unor pacienți cu sau fără multiplicare virală. Neavând specificitate de *situs*, metoda hibridării poate fi folosită pentru detectarea ADN viral numai după expansiunea clonală a celulelor în care s-a integrat ADN. Generarea clonei este primul stadiu în geneza CHC produs de micotoxine. Intervalul lung între infecția virală inițială și dezvoltarea tumorii este compatibilă cu conceptul expansiunii clonale a hepatocitelor în care s-a integrat ADN viral.

Prin analogie cu modelul activării oncogenelor prin mutageneză de inserție, indusă de virusurile oncogene ADN, s-a presupus că la rața de Pekin, virusul se integrează lângă sau la N-myc2, o pseudogenă a N-myc și stimulează activarea transcrierii N-myc2.

Neoplazia hepatică este aproape totdeauna asociată cu ciroza la vârsta de 20–40 de ani.

Producerea HBs în ficatul purtătorilor la care multiplicarea virală s-a stopat, ca și în multe tumori, sugerează că ADN viral integrat este transcris și tradus. Funcționalitatea acestui

promotor argumentează ipoteza perturbării transcrierii genelor celulare ce pot să ducă la pierderea controlului creşterii.

Un alt mecanism al transformării maligne ar putea fi prin expresia unei oncogene, activată de genomul viral integrat. Genomul HBV nu conţine o astfel de genă, dar gena x codifică un transactivator al transcrierii şi probabil proteina oncogenei celulare perturbă controlul transcrierii.

Bibliografie

Robins W. S. 1991. *Hepadnaviridae* and Their Replication, în vol. Fundamental Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Seeger C., Mason W. S. 2000. Hepatitis B Virus Biology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 60, no. 1, pp. 51–68.

Blonstein A. 1993. *Hepatitis B Virus*. Karger Gazette, no. 57.

Howard C. R., Zuckerman A. J. 1990. *Viral Hepatitis*, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Chisari F. V. 1995. *Hepatitis B* Virus Immunopathogenesis. Annu. Rev. Immunol., 13: 29–60

Sherker A. H., Marion P. L. 1991. *Hepadnaviruses* and Hepatocellular Carcinoma. Annu. Rev. Microbiol. 45: 475–508.

Thomas H. C., Waters J. A. *Hepatitis B* Virus, Infection and Immunity, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed., ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.

Ganem D. 1996. *Hepadnaviridae* and Their Replication, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott -Raven Publishers, Philadelphia.

Feitelson M. 1992. *Hepatitis B virus* infection and primary hepatocellular carcinoma. Clin. Microbiol. Rev. 5, 275–301.

Valsamakis A. 2007. Molecular Testing in the Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B. Clin. Microbiol. Rev. 20: 426–439.

Harrison T. J., Dusheiko G. M., Zuckerman A. J. 2004. *Hepatitis Viruses*, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Harrison T. J. 2008. *Hepadnaviruse: General Features*, în vol. Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology, editors Brian W. J. Mahy, Marc H. V. van Regenmortel, Academic Press.

Carter J. B., Saunders V. A. 2007. Virology: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Ltd.

21. 18. Familia Retraviridae

Structura şi multiplicarea retravirusurilor

Retraviridele sunt o familie mare de virusuri infecţioase pentru vertebrate, foarte importante pentru patologia umană şi animală, dar şi instrumente de studiu experimental de o valoare remarcabilă. Ele au o organizare structurală şi genetică uniformă, dar manifestă o gamă largă de interacţiuni cu gazdă, de la *infecţii benigne* produse de *virusurile endogene*, infecţii moderat patogene produse de cele *exogene*, până la consecinţele fatale ale infecţiei cu virusul imunodeficienţei şi ale celor rapid oncogene.

Retravirusurile se disting prin următoarele proprietăţi funcţionale:

- genomul retraviral, sub forma unei catene duble de ADN, se integrează ireversibil ca *provirus* într-un cromosom al celulei gazdă;
- unele au capacitatea de a încorpora secvenţe de ADN din celulă, considerate ca *oncogene*. Studiul interacţiunii retravirusurilor cu celula a permis explicarea moleculară a mecanismului oncogenezei;
- modifică activitatea genelor adiacente situsului de integrare a provirusului.

Structura virionului

Virionul este învelit, de formă sferică, cu diam. de 100– 130 nm. Nucleocapsida (regiunea centrală) are formă nedefinită (sferică, alungită, conică) şi include genomul şi 3–4 proteine, cu rol catalitic în ciclul de multiplicare.

Capsida este formată din proteina capsidală (p24) distribuită în cele circa 390 de capsomere, aşezate după modelul simetriei *icozaedrice*. Fiecare capsomeră este formată prin agregarea mai multor polipeptide, de 3–4 tipuri.

Genomul ARN (două molecule identice) este asociat cu câteva proteine virale (*o protează, revers-transcriptaza* (RT), *integraza* şi proteina *nucleocapsidei* (NC, p9). Genomul este împachetat strâns în capsidă, iar după dezagregarea blândă a virionului devine filamentos.

Proteina *matriceală* (MA, p17) acoperă nucleocapsida. În interiorul matricei se găsesc proteinele accesorii *Nef, Vpr, Vif, Vpu.*

Nucleocapsida este acoperită de *peplos*, format din dublul strat fosfolipidic, de origine membranară, în care sunt inclavaţi spiculii glicoproteici, codificaţi de virus, cu formă prismatică şi butonată. Spiculii sunt formaţi din 3 heterodimeri ai proteinei TM (41 kDa) şi ai proteinei SU (121 kDa). Pe suprafaţa virionului proemină 7–14 spiculi. Invelişul este dobândit în cursul maturării virionilor, prin înmugurire din membrana citoplasmatică (fig. 433).

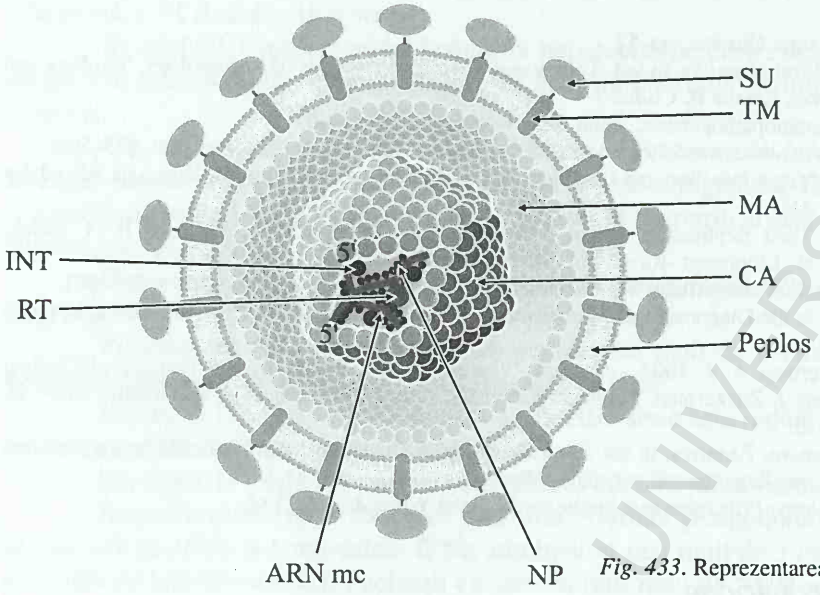


Fig. 433. Reprezentarea schematică a structurii unui retravirus.

Clasificare. Familia *Retraviridae* a fost împărţită în 3 subfamilii pe baza criteriilor de patogenitate: *Oncovirinae, Lentivirinae* şi *Spumavirinae.* O clasificare recentă propune divizarea oncovirinelor în 5 genuri:

- *Alpharetravirus* (virusurile leucozei şi sarcomului aviar);
- *Betaretravirus* (virusul tumorii mamare a şoarecelui – MMTV);
- *Gamaretravirus* (virusurile leucemiei şi sarcomului mamalian);
- *Deltaretravirus* (virusul limfotropic T uman şi virusul leucemiei bovinelor);
- *Epsilonretravirus* (virusul infecţios al peştilor);
- *Spumavirus* (produce degenerarea 'spumoasă' a celulelor infectate, dar nu este asociat cu procese patologice cunoscute);
- *Lentivirus* (virusuri ce produc infecţii cronice, cu progresie neurologică lentă).

Virionii acestei familii se descriu după mai multe criterii:

- în funcţie de *tipul structural* (tip A, B, C, D);
- de receptorul celular care mediază pătrunderea;
- de modul de propagare (exogene şi endogene);
- după prezenţa sau absenţa unei *oncogene* în genomul lor.

Retravirusurile *exogene* se transmit pe orizontală, se comportă ca agenţi infecţioşi propriu-zişi şi se găsesc numai în celulele infectate, iar cele *endogene* se găsesc ca provirus integrat în ADN în celulele somatice şi germinale şi se transmit pe verticală, prin mecanisme mendeliene, de la o generaţie la alta prin celulele liniei germinale. Informaţia genetică virală este o componentă constantă a genomului fiecărei celule, deoarece provirusul integrat se comportă ca un grup de gene controlate de

POLITEHNICA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

celulă. Multe vertebrate, inclusiv omul, posedă copii multiple ale ARN viral. Virusurile endogene nu sunt patogene pentru gazdă şi nu transformă celulele *in vitro*.

Tipul *structural* (particule de tip A, B, C, D) de clasificare a retravirusurilor are la bază aspectul electrono-optic al virionilor şi al precursorilor lor în celula infectată.

Particulele de *tip A* sunt nucleocapside de formă sferică, asamblate în citoplasmă, înainte de înmugurire.

Particulele de *tip B* se formează prin învelirea particulelor de tip A la nivelul membranei citoplasmatice.

Nucleocapsida particulelor de *tip C se asamblează treptat*, pe măsură ce înmugurirea progresează (co-asamblare).

Particulele de *tip D* rezultă prin înmugurirea nucleocapsidelor preasamblate, ca şi particulele de tip B, dar regiunea internă are aspect tubular.

Subfamilia *Oncovirinae* cuprinde mai multe grupuri de virusuri:

– grupul virusurilor aviare, care induc leucoze şi sarcoame, include virusuri exogene şi endogene (virionii sunt de tip C);

– grupul virusurilor mamaliene de tip C include virusuri endogene şi exogene infecţioase pentru rozătoare, carnivore, primate. Unele tulpini de virus conţin gene oncogene;

– *grupul HTLV-BLV* (*H*uman *T* (*bovine B*) *l*ymphotropic *v*irus) cuprinde virusuri exogene care produc limfoame ale limfocitelor T la om şi ale limfocitelor B la bovine.

Oncovirinele induc malignităţi din categoria *sarcoamelor, leucemiilor, limfoamelor* şi *carcinoamelor mamare.* Sunt infecţioase pentru o largă diversitate de specii, de la peşti până la om.

Subfamilia *Lentivirinae* cuprinde virusuri exogene ce produc maladii neurologice şi deficienţe imunitare, fără a fi implicate direct în producerea malignităţilor: HIV 1, HIV 2, virusurile imunodeficienţei bovinelor (BIV), felinelor (FIV), maimuţelor (SIV), virusul artritei şi encefalopatiei caprinelor (CAEV), virusul pneumoniei progresive a ovinelor (maedi) şi virusul Visna, virusul anemiei hemolitice a calului etc. Virusurile Visna şi maedi produc infecţii cu evoluţie lentă la ovine. Virusul Visna infectează toate organele, dar modificările patologice sunt limitate în primul rând la SNC, plămân, celulele SFM. SNC se infiltrează cu celule inflamatorii, curând după infecţie, dar perioada de incubaţie este lungă (de ordinul anilor), înainte de apariţia simptomelor neurologice. Maladia poate să progreseze rapid, în câteva săptămâni, sau lent, în câţiva ani.

Subfamilia *Spumavirinae* cuprinde virusuri care produc infecţii persistente, cu vacuolizarea celulelor *in vitro*. S-au izolat de la om şi de la primate. *In vivo* nu produc îmbolnăviri cunoscute şi definite clinic.

Cele mai studiate sunt *virusul sarcomului Rous* (*VSR*) şi *virusul leucemiei aviare* şi *murine*. VSR nu este un virus natural, deoarece nu persistă în populaţiile animale, ci este o creaţie de laborator, transferată şi păstrată de virologi.

Organizarea genomului

Genomul retravirusurilor are câteva particularităţi unice:

– este singurul *genom diploid* ;
– este singurul replicat şi prelucrat de aparatul de transcriere şi replicare a ARNm celular;
– este singurul asociat cu ARN specific celulei, a cărei funcţie este *iniţierea replicării*;
– este singurul genom ARN de polaritate pozitivă, care *nu funcţionează ca ARNm*.

Genomul retravirusurilor are o structură *dimerică*. După extracţia din virioni, fără denaturare, proprietăţile fizice (sedimentare, mobilitate EF) denotă că genomul are dimensiuni duble faţă de moleculele denaturate. Cele două molecule au secvenţe identice de baze (35 S fiecare) şi formează un ansamblu de 70 S. Probabil au numeroase puncte de asociere, necovalente, dar cel mai stabil este la capătul 5' al fiecărui genom.

Semnificaţia diploidiei retravirusurilor nu este cunoscută, dar una dintre consecinţe este rata foarte înaltă a evenimentelor de *recombinare* ceea ce permite repararea eficientă a leziunilor fizice ale genomului.

La capătul 5', ARN viral este *bonetat* sub forma m7GpppGmp, este metilat la nivelul unor resturi de adenină (metilări interne), iar la capătul 3', genomul conţine o secvenţă de circa *200 resturi de poli-A*, o modificare tipică celor mai multe ARNm de la eucariote.

Genomul (fig. 434) este asociat cu alte molecule, care se evidențiază după denaturarea genomului nativ: *ARNt și ARN de tip ribosomal*. Cea mai importantă este unica moleculă de ARNt/genom, asociată cu o secvență complementară, aproape de capătul 5' al genomului. ARNt funcționează ca *primer*, la nivelul căruia RT inițiază sinteza ADN. Funcția celorlalte tipuri de ARN din virion nu este cunoscută.

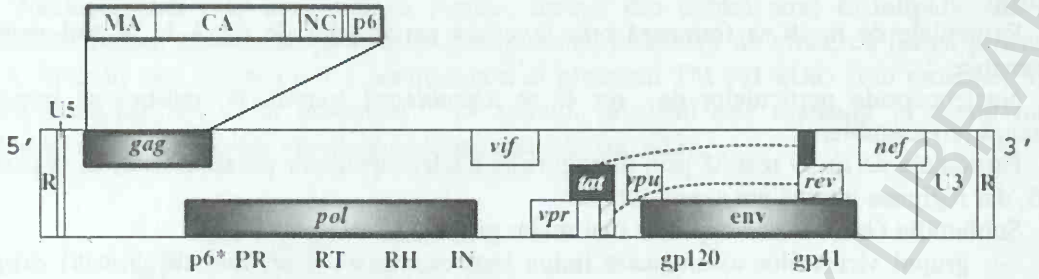


Fig. 434. Organizarea genomului retraviridelor (după Carter și col., 2007).

În regiunile terminale ale genomului se găsesc secvențele necodificatoare, cu rol de *semnale* pentru sinteza ADN sau ARN și pentru prelucrare, iar *regiunile interne* au funcții de codificare a proteinelor. Începând cu capătul 5', secvențele comune tuturor retravirusurilor sunt:

- *secvențele R* (*R*edundant), cu o lungime variabilă de 12–135 de baze, sunt identice la ambele capete ale genomului, la toate retravirusurile și au rol important în procesul transcrierii inverse, deoarece permit transferul ADN nascent, de la un capăt la celălalt al matriței de ARN genomic;
- *secvența U_5* este prima copiată în ADN, în transcrierea inversă și devine capătul 3' al secvenței lungi repetată terminal (*LTR* = *L*ong *T*erminal *R*epeats), ce flanchează catena ADN. Secvența LTR ce conține promotorul și alte elemente reglatoare este divizată în 3 secvențe: U_3, R, U_5. U_3 controlează transcrierea provirusului, bonetarea și poliadenilarea ARNm;
- *secvența PB* (*P*rimer *B*inding) este formată din 18 nucleotide și constituie situsul de atașare a primerului ARNt, pe baza unei complementarități perfecte;
- *secvența L* (Leader) precede prima regiune tradusă și are cel puțin două funcții: a) este situsul de inițiere pentru transcrierea tuturor tipurilor de ARNm înnădite; b) are rolul semnalului de împachetare a genomului în virion;
- *regiunea codificatoare* începe cu gena *gag* și se termină cu gena *env* și este tradusă în întregime. Se produce chiar o suprapunere a cadrelor de citire. Regiunea tradusă conține semnale interne, cu rol de situsuri de înnădire, de unde se formează diferite tipuri de ARNm;
- *secvența PP* (*P*olipurinică) conține cel puțin 9 resturi de A și G. Aici se inițiază sinteza catenei ADN de polaritate pozitivă;
- *secvența U_3* (*U*ntranslated), netradusă, este simetrică secvenței U_5 și devine capătul 5' al LTR, care flanchează catena de ADN. Secvențele LTR au rol în integrarea ADN viral în cromosomul celulei.

Regiunea codificatoare cuprinde gene care codifică proteine, așezate în aceiași ordine la toate retravirusurile.

Pe baza complexității genomului și a mecanismului de multiplicare se disting retravirusuri *simple* și *complexe*. Cele simple au genomul format din cele 3 gene esențiale: *gag, pol, env*. Lentivirusurile au un genom mai complex: *gag, pol, env*, la care se adaugă genele reglatoare.

Regiunea gag codifică *antigenul specific de grup*. ARNm transcris din toată secvența *gag*, este tradus ulterior într-o poliproteină precursoare (p55), supusă unui proces de clivare în 3–5 proteine capsidale. Proteinele codificate constant de secvența *gag* sunt: *proteina MA (matriceală- p17 necesită legarea cu acidul miristoic pentru legarea strânsă de înveliș)*, proteina de *înmugurire* (p6) din alcătuirea învelișului viral, *proteina CA (capsidală- p24,* componenta structurală majoră a virionului, indicatorul clinic pentru măsurarea antigenemiei) și *proteina NC* (p7) asociată ARN genomic.

Regiunea *pro* codifică sinteza *proteazei*, care clivează poliproteinele *gag* şi *pol*.

Regiunea pol codifică sinteza a două proteine esenţiale în fazele timpurii ale ciclului infecţios: *revers-transcriptaza (RT)* şi *integraza (IN)*, care catalizează integrarea ADN viral într-un cromosom celular.

Secvenţele *pro* şi *pol* nu sunt gene distincte. Ele sunt transcrise în ARNm al genei *gag*, iar traducerea are loc numai în cazul în care complexul enzimatic al traducerii depăşeşte codonul semnal de terminare a secvenţei gag. Toate proteinele precursoare care conţin proteinele *pro* şi *pol* conţin întreaga proteină *gag*.

Regiunea env codifică o glicoproteină precursoare de înveliş, de 150–160 kDa, clivată în glicoproteina de 120–135 kDa – *SU* (*S*urface) şi *TM* (*T*ransmembrane), de 40–50 kDa. După clivare, cele două proteine rămân asociate prin legături necovalente. Proteina *SU* are rolul de a recunoaşte receptorul celular, iar proteina *TM* ancorează complexul *proteina SU-receptor*, de învelişul viral.

Spre deosebire de celelalte gene, gena *env* este transcrisă dintr-un ARN subgenomic înnădit.

Proteinele enzime ale virionului. Produsul de sinteză a genei *pol* este scindat de proteaza virionică şi rezultă *revers-transcriptaza* (RT) şi *integraza.*

RT, spre deosebire de alte polimeraze virale, este uşor separabilă de componentele virionului. Este un *heterodimer* alcătuit din subunitatea de 66 kDa cu activitate catalitică şi subunitatea 51 kDa. RT are şi activitate RN-azică H, ce degradează matriţa de ARN.

Integraza catalizează inserţia aleatorie a ADN viral în genomul celulei gazdă.

Proteaza este o aspartil-protează homodimerică, catalizează clivările ce separă proteinele *gag* şi *pol* una de cealaltă.

Proteinele de înveliş sunt asemănătoare la toţi membrii familiei, fiind formate din două catene polipeptidice, legate prin punţi S-S:

- *proteina SU* (gp 120) are 5 domenii, legate prin punţi S-S. Domeniul V_3 este epitopul major recunoscut de RCT. Are rolul de a recunoaşte receptorul membranar al celulei sensibile. Anticorpii specifici neutralizează infecţiozitatea virală, dar glicozilarea extensivă împiedică legarea Ac;
- *proteina TM* (gp 41) are trei domenii: citoplasmatic (20–30 de aminoacizi), transmembranar şi extern, asociat cu *proteina SU*. Cele două proteine rezultă prin clivarea proteinei 160, catalizată de o protează a celulei gazdă.

Ciclul de multiplicare

Ciclul multiplicării retravirusurilor are două faze distincte, separate de treapta *integrării*. Evenimentele primei faze sunt catalizate de *enzimele virionului*, iar cele ale fazei a II-a, de *enzimele celulare*.

Virionii se ataşează de moleculele *receptor* ale celulei sensibile prin intermediul *proteinei SU*. Învelişul viral şi membrana *fuzionează*, astfel încât nucleocapsida virionului este eliberată în citoplasmă.

În interiorul *nucleocapsidei* parţial dezvelită, are loc *transcrierea inversă** a ARN genomic, în ADN dublu catenar, proces catalizat de RT virală. *ADN este intermediarul de replicare* şi transcriere a genomului retraviral. Concluzia existenţei intermediarului ADN a fost emisă de H. Temin şi D. Baltimore (1970), pe baza rezultatelor experimentale cu privire la sensibilitatea replicării acestor virusuri la *actinomicina D*. Antibioticul interferă cu procesul de transcriere ADN-ARN, deoarece se leagă cu mare afinitate de ADN şi stopează funcţia ARN-polimerazei. În celulele infectate cu ribovirusuri obişnuite, actinomicina D blochează sinteza ARN celular, dar nu modifică sinteza ARN viral. În celulele infectate cu retravirusuri, actinomicina D inhibă complet sinteza ARN (celular şi viral) şi, în consecinţă, inhibă multiplicarea virală, ceea ce reflectă dependenţa replicării şi transcrierii ARN de un intermediar ADN.

* Fiecare virion conţine una sau mai multe molecule de RT. Activitatea catalitică a RT s-a evidenţiat după permeabilizarea virionilor cu detergent neionic şi incubare în tampon cu dezoxinucleotid-trifosfaţi, unul fiind marcat radioactiv. Se sintetizează ADN complementar (ADNc), dar reacţia este blocată în prezenţa actinomicinei D.

Revers-transcriptaza este *multifuncţională*:

- un domeniu al enzimei catalizează sinteza unei catene de ADN cu polaritate negativă, complementară faţă de catena ARN a genomică, pe care o utilizează ca matriţă. RT este o

ADN-polimerază dependentă de ARN. Enzima utilizează ca matriță nu numai o moleculă de ARN, ci și o catenă de ADN: utilizează ca matriță, catena de ADN de polaritate negativă și catalizează sinteza catenei de polaritate pozitivă (fig. 435);

– un alt domeniu are acțiune *RN-azică* (RN-aza H; H = Hibrid) și degradează catena ARN din hibridul ARN-ADN. RT acționează atât ca endonuclează, cât și ca exonuclează și produce *grupări 3'OH și 5'P*, lăsând un oligoribonucleotid ca primer pentru sinteza celei de a II-a catene de ADN. Grupările 3'OH generate de RN-aza H sunt substratul acțiunii ADN-pol.

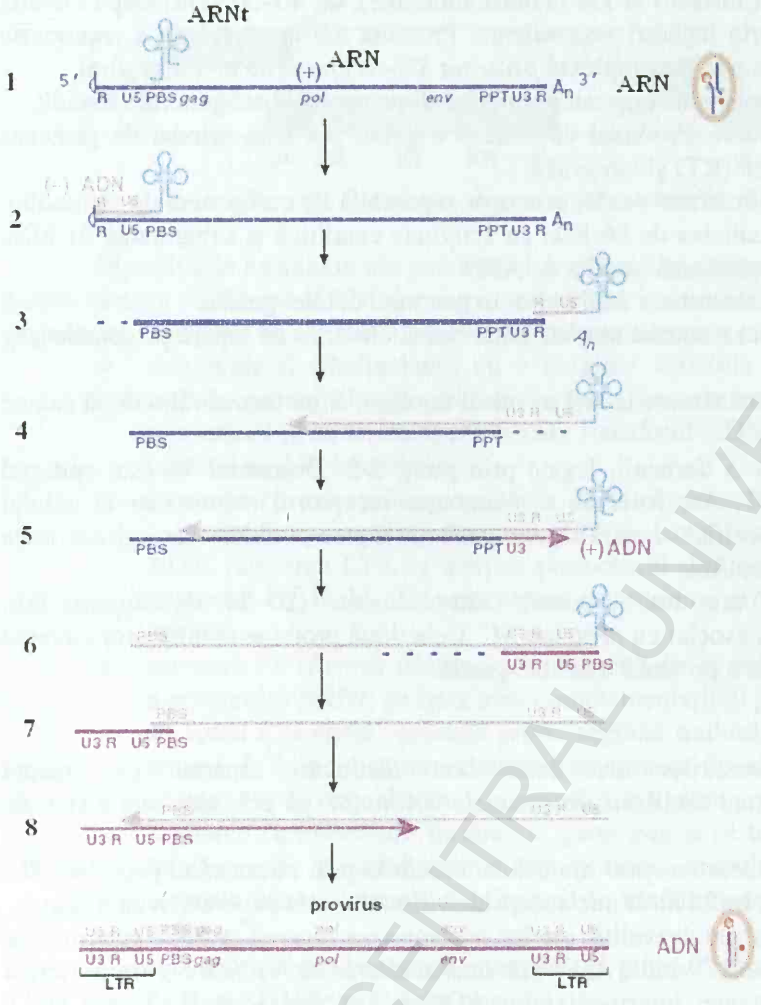


Fig. 435. Ilustrarea schematică a mecanismului revers-transcrierii. RT utilizează ca primer ARNt de origine celulară și sintetizează o secvență scurtă de ADN la capătul 5' al matriței, după care complexul molecular de transcriere format din RT, factorii celulari de transcriere și secvența scurtă de ADN, sare la capătul opus (3') al matriței și apoi progresează până la terminarea sintezei primei catene de ADN. Catena de ADN are rol de matriță pentru sinteza celei de a II-a catene. Cele două catene de ADN sunt mai lungi decât matrița, prin copierea dublă a secvențelor repetate direct de la capetele matriței (U_3 și respectiv U_5). Secvențele duble constituie LTR. PBS = situsul de legare a polimerazei (după *John B. Carter* and *Venetia A. Saunders*, 2007).

Activitatea RT este dependentă de un ARN primer. Rolul de *primer* îl are ARNt asociat genomului viral, iar pentru sinteza catenei de polaritate pozitivă rolul de primer revine catenei de ARN genomic clivată la nivelul secvenței PP (A,G), sub acțiunea RN-azei H.

Copia de ADN dc este mai lungă decât matrița de ARN, datorită duplicării secvențelor repetate direct de la fiecare capăt și rezultă LTR. Fiecare LTR conține secvențe unice derivate de la ambele capete ale genomului (U_3 și U_5), care încadrează un element repetat – R – în structura U_3-R-U_5.

Sinteza ADN pare a avea loc în interiorul nucleocapsidei, în citoplasmă, în primele 4–8 ore după infecție. Produsul sintezei este o *moleculă de ADN dc lineară.* În această conformație, molecula este transportată în *nucleu.*

Capetele ei sunt reunite sub acțiunea unei *ligaze* de origine celulară. Se formează astfel, o moleculă de *ADN, circulară, închisă covalent.*

Integrarea. Provirusul asociat cu unele proteine virale este transportat spre nucleu ca un complex de preintegrare. Cele mai multe retravirusuri se integrează numai când celula intră în mitoză.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În cursul mitozei, membrana se dezintegrează şi favorizează integrarea. Infecţia productivă ar avea loc numai în celulele care se divid. Dar, HIV şi alte retravirusuri pot infecta celulele în repaus, deoarece complexul preintegrării intră în nucleu.

Integrarea genomului viral, în ADN celular este un proces unic, deoarece se integrează sub forma ADN dc, linear. Integraza asociată genomului viral taie cele cele două catene ale ADN viral, la secvenţe specifice, dar şi catenele de ADN cromosomal celular şi probabil menţine capetele ADN linear în proximitate strânsă. Integraza produce clivări succesive la capetele LTR şi în ADN celular. Ligazele celulare leagă şi repară capetele celor două molecule de ADN. ADN viral integrat devine *provirus* şi fiecare LTR este mai scurt cu două perechi de baze.

Integrarea are o specificitate înaltă, adică totdeauna aceleaşi secvenţe ale ADN viral se găsesc în asociaţie cu ADN celular. Din punctul de vedere al situsului cromosomal, integrarea este mai puţin specifică. Există tendinţa ca integrarea să aibă loc la *situsuri cromosomale transcrise activ*, a căror *structură cromatică este laxă.*

Provirusul integrat poate fi exprimat imediat sau nu este transcris şi infecţia evoluează latent. Dacă celula infectată latent se divide, provirusul este copiat odată cu genomul celulei şi fiecare celulă fiică primeşte o copie a provirusului.

Integrarea genelor virale poate produce mutaţii prin inserţie, ce pot activa oncogenele, pot inactiva GST (genele supresoare ale tumorilor) sau determină un efect letal.

Transcrierea şi replicarea genomului

Cele două LTR ale provirusului au secvenţe identice, dar diferă funcţional. Transcrierea este iniţiată la un capăt al secvenţei codificatoare şi se termină la celălalt. LTR 5' are activitate de promotor, adică are situsuri de legare (TATA box) pentru iniţierea şi reglarea transcrierii. Toate retravirusurile studiate au TATA box în domeniul U_3. ARN-pol II a celulei începe transcrierea la joncţiunea U_3-R. Procesul se termină la joncţiunea R-U_5. Copiile sunt bonetate şi poli-adenilate. Unele copii vor funcţiona ca mesageri, iar o parte dintre ele se înnădesc. Alte copii ale ADN proviral devin genomuri ale virionilor progeni.

Transcrierea ADN proviral este reglată de secvenţa *enhancer* (stimulatoare) cu acţiune *cis*, ce amplifică promotorii virali şi celulari. Elementele enhancer sunt active numai în anumite ţesuturi şi celule sau numai în anumite stadii ale ciclului celular sau numai la anumite specii. Existenţa sau absenţa elementelor *enhancer* explică tropismul viral pentru anumite celule, independent de receptorii membranari.

Retravirusurile sunt sisteme genetice care au o înaltă capacitate de a schimba informaţie genetică cu celula gazdă. Sunt singurele care dobândesc gene celulare şi le convertesc la *oncogene.*

Integrarea ADN proviral este stabilă, *ireversibilă.* Nu există mecanisme de excizie, de replicare independentă de cromosom, sau de translocaţie de la un situs la altul.

Replicarea genomului viral integrat se face prin mecanismul *transcrierii ADN proviral*, în ARN.

*Transcrierea** este catalizată de ARN-polimeraza II celulară. În celulele Ek, transcrierea începe la un situs specific şi se termină la o secvenţă în aval de genă. Iniţierea şi terminarea transcrierii definesc limitele unităţii funcţionale – gena. Terminarea transcrierii este cuplată cu prelucrarea: clivarea şi poliadenilarea capătului 3'.

* Cea mai mare parte a ADN la Ek este organizată sub forma nucleosomilor, care constau din 165 pb, înfăşurate de 2 ori în jurul unui octamer histonic, alcătuit din 2 dimeri H_2A-H_2B şi un tetramer alcătuit din 2 H_3 şi 2 H_4. În această conformaţie, ADN este inaccesibil transcrierii. H_1, asociată nucleosomului, este un inhibitor puternic al transcrierii. În ADN transcris activ (promotor şi enhancer), nucleosomii sunt dislocaţi, iar spirele ADN rămân expuse şi uşor accesibile transcrierii.

În timpul transcrierii, este necesar ca ARN-pol să se rotească pe matriţa de ADN, sau ca altă proteină să acţioneze pentru atenuarea tensiunii de supraspiralizare. Topoizomeraza I este implicată în despiralizarea ADN pentru transcriere.

În general, unităţile de transcriere sunt mai lungi decât necesarul de codificare a unei proteine. Provirusul ADN funcţionează ca o singură unitate cistronică şi este transcris într-o singură moleculă de ARN. Prelucrarea* ulterioară a copiilor în *ARN genomic sau în ARNm* este catalizată de enzimele celulare.

* Toate moleculele de ARNm la eucariote, cu excepţia ARNm al histonelor, au secvenţa poli-A, adăugată post-transcriere la capătul 3', sub acţiunea unei enzime multimere. Poli-A (200–300 nucleotide) de la capătul 3' al ARNm, probabil conferă stabilitate, uşurează translocaţia nucleo-citoplasmatică şi condiţionează chiar traducerea. Secvenţa poli-A este prezentă la 85–88% dintre moleculele de ARNm la vertebrate. La 12–15% se găseşte o altă secvenţă: AUUAAA sau AUAAA. Prezenţa U în poziţia a 3-a este esenţială pentru clivajul endonucleolitic al ARNm.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI BIOLOGIE

O parte dintre copiile de ARN sunt prelucrate în nucleu prin *bonetare şi poliadenilare* şi rezultă ARN genomic. Restul copiilor sunt *clivate şi înnădite* şi vor genera ARNm pentru sinteza proteinelor virale (*gag, gag-pro-pol, env*) în diferite combinaţii cantitative.

Traducerea. Proteinele *gag, pro, pol* sunt sintetizate de polisomii liberi, iar glicoproteina *env*, pe poliribosomii asociaţi reticulului endoplasmic.

Proteina *env* este sintetizată cu o secvenţă leader, clivată în cisternele reticulului endoplasmic. Glicozilarea şi clivarea în unităţile SU şi TM se fac în cisternele golgiene, sub acţiunea enzimelor celulare. În absenţa clivajului, virionii nu sunt infecţioşi. Cele două proteine se inseră pe faţa externă a membranei citoplasmatice.

Asamblarea şi înmugurirea sunt procese simultane la majoritatea retravirusurilor şi sunt asociate cu membrana citoplasmatică.

Proteinele regiunii centrale a virionului (*NC, RT, IN, PR*) se asociază cu ARN genomic şi formează nucleocapsida, care la rândul ei recunoaşte specific proteina *env* (*SU* şi *TM*) inserată în membrana şi concomitent are loc *înmugurirea.*

Multiplicarea virusurilor oncogene nu interferă cu procesele vitale ale celulei. Celulele infectate nu mor. Ele sunt transformate malign, se divid şi concomitent produc virus progen. Este o *transformare productivă.*

Proprietăţile noi dobândite după infecţia cu retravirusuri (starea malignă şi producerea de virus), se transmit generaţiilor succesive de celule prin intermediul provirusului. Integrarea ADN viral este baza genetică a permanenţei infecţiei cu retravirusuri.

Retravirusurile infecţioase pentru om sunt:

- HIV-1 şi HIV-2;
- HTLV 1 şi 2 (produc leucemia celulelor T la adult şi tulburări neurologice);
- spumavirusul primatelor detectat în carcinomul nazofaringian cultivat;
- virusurile endogene (HERV). Se comportă ca secvenţe mendeliene în cromsomii umani şi reprezintă infecţii 'fosile" ale celulelor germinative. Sunt virusuri defective, deoarece nu au fost izolate în formă infecţioasă, spre deosebire de PERV (virusuri endogene ale porcinelor).

Subfamilia Lentivirinae

Virusurile acestei familii produc infecţii cu o perioadă lungă de incubaţie, persistă în competiţia cu efectorii RI, infectează mai multe organe, iar infecţiile au o evoluţie lentă, dar fatală.

Pe baza tropismului faţă de celule, lentivirusurile pot fi împărţite în două grupe :

- virusuri care se multiplică predominant în *macrofage*: virusul anemiei infecţioase a equinelor (EIAV), lentivirusurile ovinelor (virusurile pneumoniei progresive şi virusul maedi-visna); lentivirusurile caprinelor (virusul artritei-encefalitei);
- virusuri care se multiplică în *limfocite şi macrofage*: HIV, SIV, FIV.

Toate au acelaşi set de gene structurale (*gag, pol, env*) ce codifică proteinele regiunii centrale, RT şi glicoproteinele de înveliş. Genele reglatoare (*tat, rev, vif, vpu, vpr, nef*) controlează transcrierea genelor, transportul ARN şi traducerea. Ele au omologie limitată la diferite lentivirusuri, dar funcţiile sunt aceleaşi. Probabil, ele au fost transduse din genomul gazdei şi favorizează persistenţa şi patogeneza.

Istoric. Anemia cronică recurentă a calului este recunoscută în Europa din 1843, iar agentul inductor a fost primul virus identificat (1904) infecţios pentru animale (EIAV), dar pentru că n-a fost cultivat *in vitro*, studiul biologiei moleculare a întârziat. EIAV este transmis de tabanide, dar nu se multiplică în artropodul vector.

Pneumonia progresivă a ovinelor produsă de un lentivirus a fost descrisă în Africa de sud (1915), iar în 1930 s-a recunoscut o nouă formă de *pneumonie cronică* în Islanda (*maedi*). În deceniul următor s-a descris o nouă maladie neurologică, caracterizată prin paralizie şi epuizare (*visna*), numai la turmele care aveau maladia pulmonară maedi. Maladia visna-maedi a apărut în Islanda numai după importul a 20 de berbeci karakul.

Infecţia caprinelor cu lentivirusuri s-a descris în 1974, la iezii de 1–4 luni. Virusul produce artrită şi leucoencefalomielită. Ulterior s-a descoperit BIV, HIV-1 şi HIV-2.

Primul retravirus infecţios pentru organismul uman, a fost izolat de R. Gallo (1980) şi la denumit *HTLV* (*H*uman *T L*ymphotropic *V*irus), datorită tropismului său pentru limfocitele T mature, agentul cauzator al leucemiei celulelor T. Celulele maligne nu produc virus, astfel că blocarea multiplicării virale nu are semnificaţie terapeutică. S-au identificat două variante serologice ale virusului leucemiei limfocitelor T: HTLV I şi HTLV II.

Ulterior s-au descoperit lentivirusurile infecţioase pentru maimuţe (macaccus, mandril, maimuţă verde africană, cimpanzeu). La gazdele naturale, lentivirusurile maimuţelor sunt relativ nepatogene, dar transferul lor la specii care nu sunt purtătoare de virus, produce îmbolnăvirea. Aşa s-a întâmplat cu visna-maedi în Islanda, după aducerea oilor karakul şi cu HIV în Africa. *FIV* este ultimul lentivirus identificat, producător de imunodeficienţă.

HTLV I produce leucemia celulelor T la adult (ATL) şi limfomul, precum şi dezordinea SNC, parapareza spastică tropicală. La indivizii infectaţi (10–20 milioane pe tot globul), virusul este produs la un titru foarte scăzut. Se transmite de la mamă la făt prin secreţia lactată, prin sângele transfuzat, prin celulele infectate. În zonele endemice, peste 10% din populaţie este seropozitivă.

HTLV II s-a izolat, dar nu a fost asociat cu nici-o maladie specifică. HTLV I şi II au omologie de 65% a secvenţei de nucleotide.

Virusurile limfotrope au afinitate marcată pentru celulele T mature.

HIV. Virionul are diametrul de 100 nm, cu 72 de spicule derivate din gp120, ancorate în membrană prin gp41 (TM). HIV are un tropism foarte bine exprimat pentru limfocitele Th şi din acest motiv R. Gallo (1982) l-a denumit *HTLV III*, pentru a-l deosebi de cele 2 variante serologice HTLV I şi II. Denumirea de HIV a fost dată de ICNV. HIV şi HTLV au tropism marcat pentru limfocitele TCD_4 şi produc infecţii cu evoluţie lentă.

S-au identificat două variante serologice (subtipuri) de HIV, 1 şi 2. HIV 1 este mai agresiv şi produce imunodeficienţe severe, iar HIV 2 produce infecţii cu efecte patologice mai atenuate în sfera imunitară şi este predominant în Africa de Vest. În funcţie de specificitatea lor antigenică, există mai multe linii de HIV, toate aparţinând lui HIV 1 şi HIV 2. Se pare că există linii de HIV care nu produc manifestări clinice.

HIV 1 pare să aibă originea în SIV infecţios pentru cimpanzeu (*Pan troglodytes*), iar HIV 2 ar proveni din SIV care infectează *Cercocebus atys*. Cimpanzeii infectaţi cu HIV 1 sau cu SIV_{cpz} nu fac maladie SIDA, deşi omul şi cimpanzeul au asemănare a genelor în proporţie de 98%. Se crede că SIV_{cpz} a infectat gazda cu circa 10 000 de ani în urmă, timp în care interacţiunea a evoluat prin selecţia unor tulpini virale care nu omoară gazda. SIV_{cpz} a trecut la gazda umană, devenind HIV 1, recent, când omul a distrus jungla africană, mediul de viaţă al cimpanzeului. Probele de sânge recoltate şi îngheţate în 1959 şi analizate după descoperirea virusului au fost pozitive pentru Ac anti-HIV. HIV a evoluat din SIV_{cpz} la începutul anilor '50, un interval scurt care n-a permis selecţia unor tulpini mai puţin patogene.

Organizare genetică

Lentivirusurile au o organizare genetică mai complexă decât celelalte retravirusuri, deoarece pe lângă cele 3 gene (*gag, pol, env*), au câteva gene mici, suplimentare, reglatoare, localizate între genele *pol* şi *env* (fig. 436).

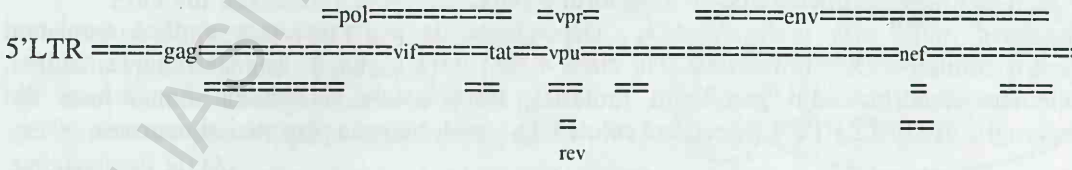


Fig. 436. Organizarea genomului HIV.

Genele reglatoare sunt transcrise timpuriu în ciclul de multiplicare, reglează cantitatea de ARN genomic şi de ARNm, precum şi transportul spre citoplasmă pentru a fi tradus. Aceste procese sunt influenţate de starea fiziologică a celulei. De exemplu, celulele TCD_4 neangajate sunt infectate neproductiv de către HIV-1.

HIV-1 are cel puțin 8 gene reglatoare și accesorii: *vif* (virion infectivity factor), *vpu, vpr, tat, rev* (reglator al expresiei proteinelor virale), *nef* (negative reglatory factor, cu rol reglator al transcrierii și al stadiilor finale ale multiplicării).

Genele sunt suprapuse, adică sunt localizate pe același segment al moleculei de ARN genomic.

Proteine reglatoare. Tat (transactivation gene) codifică un peptid de 14 kDa ce stimulează de 1000 de ori transcrierea genelor virale. Proteina este predominant citoplasmatică, dar poate fi eliberată din celulele infectate și pătrunde în celulele adiacente, deoarece are un domeniu bogat în Arg, ceea ce îi permite să se lege eficient de membrană.

Gena *rev* (reglatoare a expresiei proteinelor virale), favorizează transferul copiilor de ARNm din nucleu în citoplasmă, unde sunt traduse, deoarece ARNm virali pentru proteinele structurale, enzimatice și accesorii, au secvențe care favorizează retenția nucleară (T. Mak, 2006). *Rev* contracarează aceste secvențe și ușurează exportul ARNm virali în citoplasmă, fiind esențială pentru sinteza proteinelor virale. În absența *rev*, ARNm viral este degradat. Are rolul de a schimba infecția latentă a monocitelor, într-o infecție productivă.

Proteine accesorii. Gena *nef* (negative factor gene) codifică un peptid de 27 kDa. *In vivo* este necesară pentru multiplicarea eficientă, deoarece se leagă fizic de moleculele CMH I, CMH II și CD_4 pe suprafața celulei. Conectarea induce internalizarea moleculelor de suprafață în vezicule tapetate cu clatrină, urmată de degradarea lizosomală. Proteina *Nef* diminuează expresia HLA-A, HLA-B (dar nu HLA-C) și CD_4 pe suprafața celulelor infectate, ușurând expresia proteinei *Env*, fără interacțiunea cu CD_4.

Proteina *Vif* (viral infectivity factor) este structurală și are rol stabilizator al ADN viral nou sintetizat. Se asociază cu proteinele citoscheletului, ușurând transportul ADN viral în nucleu. *Vif* este exprimată la nivele înalte în citoplasma celulelor infectate și mărește eficiența infecției HIV *in vitro*.

Vpr (*v*iral *p*rotein *r*, 15 kDa) este necesară pentru infecția productivă, deoarece orientează ADN viral spre nucleul celulei, împreună cu proteinele nucleare (importina α și o nucleoporină); oprește celulele în faza G_2 a ciclului mitotic, stimulând producerea virusului progen.

Vpu (*v*iral *p*rotein *u,* 16 kDa), este necesară pentru infecția HIV productivă. Vpu se asociază cu noile molecule CD_4 sintetizate și le orientează spre degradarea proteasomală, diminuând expresia lor membranară. Interferă cu biosinteza moleculelor CMH I, blocând expresia lor pe suprafața membranei.

În gena *pol* (între RN-aza H și integrază), la lentivirusurile neprimatelor (FIV, EIAV, visna, CaEV) s-a identificat un segment genic ce codifică o *dUTP-ază*, o proteină structurală, a cărei funcție este de a împiedica încorporarea U în ADN. Gena este necesară pentru multiplicarea virusurilor în macrofage, celule diferențiate terminal ce nu se divid și au nivele scăzute de dUTP-ază.

Ciclul de multiplicare

Lentivirusurile au o relativă specificitate de specie, ceea ce a împiedicat crearea unui model animal pentru infecția cu HIV-1. Se multiplică (fig. 434) în *celule diferențiate terminal,* care nu se divid: monocitele și limfocitele din ganglionii limfatici, splină, măduvă osoasă, care constituie rezervorul primar.

Din rezervorul primar, monocitele și limfocitele se diseminează în toate organele: creier, plămân, articulații și în alte organe în care monocitele se maturează în macrofage, iar limfocitele se activează. În ciclul de multiplicare a retraviridelor se succed fazele timpurii și tardive. Atașarea este rezultatul legării gp120 bogat glicozilată, de receptorul celulei.

Receptorul major este *molecula* CD_4*. Dependența de acest receptor explică tropismul virusului pentru celulele CD_4^+: limfocitele Th, circa 40% dintre monocite și macrofagele tisulare, celulele foliculare dendritice din ganglionii limfatici, fibroblastele și celulele Langerhans din tegument, microglia din SNC. HIV-1 infectează celule CD_4^-: trofoblastele placentei și neuronii.

* Afinitatea virusului pentru receptorul celular CD_4 este foarte înaltă: de exemplu, moleculele solubile de CD_4 pot să inhibe competitiv infecția cu HIV. Blocarea multiplicării virale este importantă pentru că SIDA se corelează cu titru viral crescut. CD_4 în formă solubilă este un potențial inhibitor al multiplicării HIV.

Gp120 se leagă de domeniul al II-lea al moleculei CD_4. Receptorul CD_4 leagă cu afinitate înaltă gp120, dar nu și suficientă pentru infecția celului cu HIV: pentru fuziunea învelișului viral cu membrana citoplasmatică sunt necesari co-receptorii. Co-receptorii sunt receptori pentru *chemokine*,

ceea ce explică tropismul înalt al virusului pentru limfocite şi macrofage. Pentru edificarea RI, co-receptorii leagă chemokinele şi controlează traficul leucocitelor şi diferenţierea celulelor T. Cele mai multe chemokine aparţin uneia dintre cele 2 clase, în funcţie de aranjamentul resturilor de Cis la capătul N-terminal: -C- C- şi – C-X-C (C=cisteină; X=alt aminoacid). Receptorii de chemokine sunt desemnaţi cu acronimele CCR şi respectiv CXCR.

Tulpinile de HIV inductoare ale sincitiilor se fixează pe receptori celulari care se deosebesc de receptorii pentru tulpinile nesincitiale.

Al II-lea receptor pentru HIV-1 este CD_{26}, o moleculă esenţială pentru infecţia macrofagelor.

Peplosul viral fuzionează cu membrana plasmatică a celulei şi eliberează nucleocapsida. În nucleocapsida parţial deschisă, are loc reverstranscrierea ARN genomic într-o moleculă de ADN dublu catenar. Nucleocapsida este transportată prin sistemul microtubulilor până la porii membranei nucleare şi eliberează molecula de ADN viral asociată cu câteva tipuri de proteine.

Revers-transcriptaza şi ARN viral diploid formează un complex nucleoproteic. Copiile de ADN dc se identifică la două ore după infecţie. Perioada de pre-integrare durează *ore*, până la *câteva zile*. În absenţa unui semnal de activare, ADN viral* neintegrat îşi pierde capacitatea de a iniţia infecţia productivă.

* De exemplu, în celulele TCD_4, revers-transcrierea genomului HIV-1 în ADN este incompletă şi ciclul de multiplicare este stopat. După stimularea antigenică a limfocitelor CD_4, ADN viral este translocat în nucleu şi este integrat în ADN celular.

În faza târzie a ciclului, ADN viral este integrat la situsuri aleatorii în ADN celular, este transcris de ARN-pol II a celulei, asociată cu factori celulari. Sunt transcrise molecule lungi, neclivate, de ARN viitoare molecule genomice şi molecule scurte, care vor fi traduse în proteine virale.

Proteinele virale sunt prelucrate proteolitic post-traducere, de proteaze virale sau/celulare.

Iniţierea transcrierii ADN viral integrat implică elemente cis-activatoare, localizate în LTR. În faza timpurie transcrierea ARN se face cu o rată foarte scăzută ; sunt transcrise genele ce codifică proteinele reglatoare Tat şi Rev.

HIV se multiplică în celulele care activează expresia genelor virale: macrofagele diferenţiate şi limfocitele TCD_4 activate. Rezultatul multiplicării este liza. Frecvent, HIV infectează neproductiv (latent) celulele sensibile, dar nu le transformă.

Epiteliul mucoasei colorectale este o cale majoră a infecţiei cu HIV *in situ*. Infecţia celulelor epiteliului ansei intestinale, cu HIV, *in vitro*, induce dezorganizarea bordurii în perie, ceea ce poate explica malabsorbţia la unii pacienţi SIDA.

HIV poate fi izolat din *lichidul sinovial* al pacienţilor cu dureri articulare severe. Faptul sugerează că infecţia *celulelor sinoviale* sau a condrocitelor de către HIV poate contribui la simptomele reumatologice la unii pacienţi SIDA.

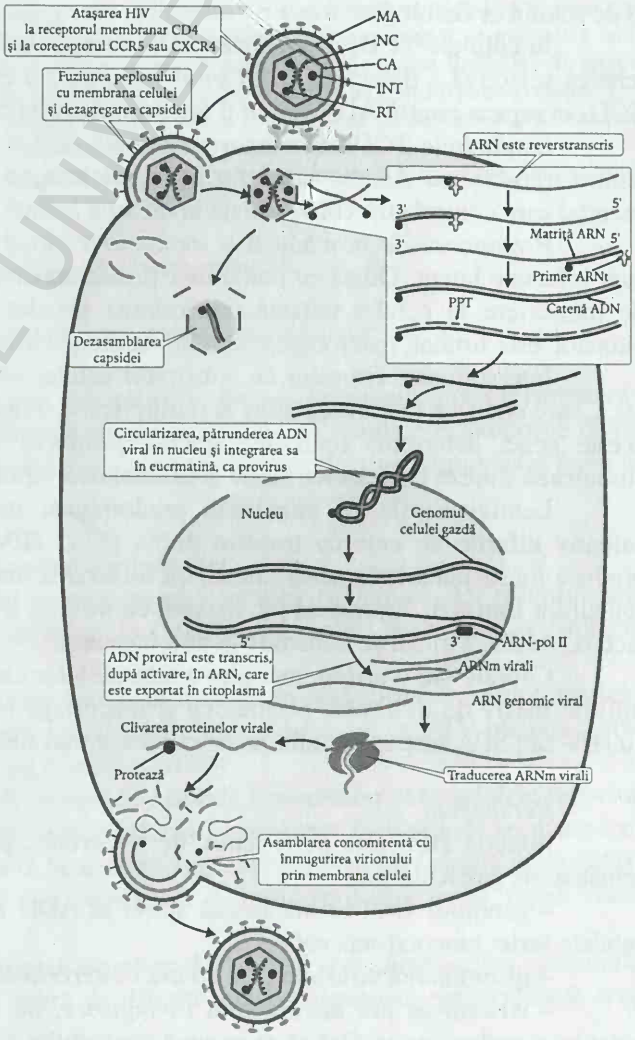


Fig. 437. Ilustrarea schematică a ciclului de multiplicare a HIV. Amănunte în text.

Utilizarea AMC specifici față de diferite componente membranare a dus la identificarea sfingolipidului *galactozil-ceramid* (GalC), ca un posibil receptor pentru HIV pe celulele neuronale. AMC anti-GalC inhibă infecția, *in vitro*, a celulelor neuronale și a celulelor epiteliale ale colonului uman, cu HIV. Concluzia este că celulele nervoase și ale epiteliului intestinal au o cale comună prin care HIV le infectează.

HIV, legat cu *Ac specifici*, poate infecta eficient macrofagele, limfocitele și alte celule care au receptorul pentru Fc. Virionii tapetați cu Ig (*Ac enhancing*) sunt mai ușor înglobați de celulele cu receptori pentru Fc.

Celulele neuronale și tisulare nu au receptori pentru HIV, dar pot fi infectate indirect, datorită tendinței limfocitelor și macrofagelor infectate de *a fuziona* cu alte celule.

Limfocitele B sunt foarte sensibile dacă au fost infectate cu virusul Epstein-Barr. Virusul pătrunde în celulă și pe calea altor receptori: receptorul pentru Fc și receptorul pentru C_3.

Dovada directă a interacțiunii HIV cu receptorul CD_4 a fost adusă exprimental: transfecția fibroblastelor umane cu gena codificatoare a glicoproteinei CD_4, le-a conferit sensibilitate la infecția cu HIV. Expresia receptorului specific nu este suficientă pentru desfășurarea ciclului de multiplicare în celulele în care s-a clonat gena pentru CD_4, dacă lipsesc alți factori celulari.

Macrofagele infectate nu sunt lizate, dar funcțiile sunt alterate și au rol de *rezervor de virus*. Genomul este organizat și funcționează după mecanismele comune tuturor retravirusurilor.

Infecția cu HIV este *cronică și productivă* ori *latentă*, în funcție nu numai de tipul de celulă, ci și de stadiul ei fiziologic.

În celulele TCD_4 neangajate, ADN integrat nu este transcris și infecția este latentă. Folosind tehnica selectivă a detectării ADN viral integrat, s-a evidențiat că mai puțin de 0,1% dintre celulele TCD_4 în repaus poartă ADN proviral integrat. Aceasta corespunde latenței postintegrare.

Limfocitele TCD_4 de memorie sau cele care se activează după infecția virală, sunt permisive pentru transcrierea ARNm viral din genomul integrat. Activarea limfocitelor pare a fi mecanismul esențial care controlează conversia de la infecția latentă la cea cronică productivă.

Promonocitele în măduvă și *monocitele* circulante, cu valori normale după infecția cu HIV, sunt infectate latent. Odată cu maturarea și diferențierea macrofagului în țesuturi sau *in vitro*, factorii de transcriere ai celulei inițiază transcrierea genelor virale și infecția devine productivă. Efectul citopatic este limitat, macrofagele rămân viabile și virusul se multiplică intens.

Interacțiunea virusului cu substratul celular este modulată de genele HIV (*tat, rev, nef, vpr* etc.), care codifică factori reglatori ai multiplicării. Transcrierea predominantă a uneia sau alteia dintre aceste gene, determină tipul de infecție: *productiv* sau *latent*. Sinteza crescută a proteinei *Tat* stimulează sinteza proteinelor virale și asamblarea virionilor progeni.

Lentivirusurile ce infectează predominant *macrofagele* (la ovine, caprine) induc leziuni calitativ diferite de cele cu tropism dublu (SIV, HIV). La oaie și capră, în organele infectate se produce un răspuns inflamator intens, cu infiltrarea macrofagelor și limfocitelor și chiar cu formarea foliculilor limfoizi. Animalele fac mastită cu infiltrat limfocitar și cu macrofage, care trece în secreția lactată. Astfel, virusul se transmite la nou-născut.

Caprele fac o artrită, mai ales a articulațiilor carpiene, cu hiperplazia membranei sinoviale, cu infiltrat masiv de limfocite, plasmocite și macrofage în țesutul subsinovial. La organismele infectate cu HIV sau SIV, răspunsul inflamator este mult mai slab.

Persistența

Infecția HIV este persistentă, de tip cronic, productivă, sau latentă și este condiționată de următoarele particularități:

– genomul viral se integrează stabil în ADN celular, ca *provirus*, în limfocitele TCD_4 și în celulele seriei *monocit-macrofag*;

– diseminarea virusului prin *contact intercelular*, astfel încât este inaccesibil anticorpilor;

– virionii se pot matura prin *înmugurire*, nu numai la suprafața celulei, ci și în cisternele reticulului endoplasmic, fără să se expună contactului cu efectorii răspunsului imun;

– *variația genetică a virionilor și variația antigenică* a glicoproteinelor de înveliș. În cea mai variabilă regiune a genomului (gena *env*), variațiile genomice individuale au rata de 1 mutație la 1000–

10.000 nt/ciclu de replicare, datorită absenței funcției de "corectare" (proof-reading) a RT. În cursul transcrierii catenei ARN în ADN de polaritate negativă, la un genom de 10.000 nucleotide, RT introduce cel puțin o mutație punctiformă (încorporarea greșită a unei baze). În afară de mutații punctiforme, genomul HIV realizează procese de recombinare, deoarece împachetează două copii de ARN genomic. Dacă se produce co-infecția celulei și co-împachetarea moleculelor distincte de ARN, RT poate schimba matrița de ARN în timpul sintezei ADN, ceea ce creează inserții și deleții, care introduc schimbări antigenice într-un singur ciclu de multiplicare. Co-infecția este greu de demonstrat *in vivo*, dar numărul crescând de forme recombinate circulante sugerează că evenimentul se produce cu o frecvență relativ crescută. Recombinanții sunt analogii reasortanților virusului influenza A. În absența vaccinului, numărul recombinanților va crește progresiv, iar transmiterea virusului va fi favorizată. Odată cu diversificarea genetică a virusului, găsirea tratamentului și a vaccinului va fi tot mai dificilă.

Substituțiile de baze în gena *env*, ca rezultat al ratei înalte de mutație se acumulează cu o rată de circa 1%/an. Pentru comparație, la dezoxiribovirusuri rata mutației este de 1 mutație la 10^8 nt/ciclu de replicare.

Glicoproteinele de înveliș (gp120 și gp41) ale diferitelor izolate de virus, chiar de la același pacient, pot să prezinte variație a 10–16% din totalul aminoacizilor

Acumularea mutațiilor dincolo de un prag critic determină apariția unor noi variante antigenice*, care nu dau reacție încrucișată, ceea ce face ca RI să fie ineficient.

* Majoritatea izolatelor HIV infectează limfocitele T sau macrofagele, dar s-au identificat tulpini cu tropism diferit pentru linii de macrofage și celule mieloide (N, B, E). Izolatele HIV de la indivizii asimptomatici se multiplică lent în celulele mononucleare stimulate cu PHA, nu formează sincitii și nu pot fi pasate în linii celulare limfoide. În contrast, izolatele HIV-1 de la pacienții SIDA se *multiplică repede*, induc formarea *sincițiilor* (Sin) și au tropism pentru celulele T.

S-a presupus că mutantele Sin sunt eliminate eficient în stadiul inițial al infecției de un sistem imunitar funcțional, dar emerg în stadiile tardive ale progresiei SIDA, după deteriorarea funcției imunitare.

Variantele NSin se detectează în tot cursul infecției cu HIV-1, chiar când predomină variantele Sin, cu tropism pentru macrofage și cu rol major în persistența virală.

Noile variante antigenice permit virusului o mai bună adaptare:
– să infecteze noi tipuri celulare;
– să dobândească rezistență la medicamente antivirale foarte eficiente;
– să scape acțiunii efectorilor imunitari.

Din punct de vedere genetic și antigenic, virionii HIV dintr-un organism infectat formează un spectru continuu de particule înrudite, dar diferite prin componentele lor chimice în proporție de până la 7–8%. Consecința directă a variației antigenice este *incapacitatea efectorilor răspunsului imun* de a elimina virusul.

Răspunsul imun anti-HIV și evoluția clinică a infecției.

Infecția cu HIV a atins, cel puțin în anumite zone, proporții epidemice. La sfârșitul anului 2002 erau înregistrați 42 milioane de indivizi infectați. În Bostwana, Lesotho, Swaziland și Zimbabwe, rata infecției variază între 31 și 38,8%.

Infecția cu HIV, inițial, are manifestări acute, urmată de o fază cronică asimptomatică cu multiplicare activă și diseminare, timp de 5–10 ani. Cursul clinic al infecției cu HIV include 3 stadii: *infecția primară, latența clinică* și *manifestarea clinică a SIDA.*

Inițial, virusul se multiplică la locul de intrare, în *celulele Langerhans* și în celulele fagocitare.

De aici se disemineză în ganglionii limfatici locali, apoi trece în sânge și se disemineză sistemic. Aceasta este etapa *viremiei primare* în faza acută a infecției și poate fi însoțită de manifestări clinice acute. Faza viremiei acute durează 2–4 săptămîni. Viremia primară scade rapid, datorită răspunsului imun mediat celular.

Infecția primară declanșează manifestarea simptomelor clinice acute nespecifice, care durează 2–6 săptămâni: dureri de cap și musculare, febră de diferite grade, adenopatie generalizată, erupție eritematoasă maculară fără prurit.

Individul devine viremic. În această fază, HIV infectează CD, macrofagele și limfocitele T CD_4 din lamina propria a epiteliilor. CD și celulele T transportă virusul la ganglionii regionali și îl

prezintă limfocitelor T CD_4 naive. Multiplicarea virală în celulele CD_4^+ progresează cu o rată exponențială. Cantitatea de virus se dublează la fiecare 6–10 ore. Incărcătura virală este de 10^5–10^7 virioni/ml sânge, iar individul are nivel maxim de contagiozitate.

Anticorpii serici neutralizanți IgM anti-HIV sunt detectabili tardiv, la 4–8 săptămâni după infecție (seroconversie). După alte câteva săptămâni se sintetizează IgG. Cele mai imunogene molecule virale sunt proteinele de înveliș (*Env, Gag*), deoarece sunt expuse timpuriu în membrana celulelor infectate.

După seroconversie, titrul Ac anti-HIV rămâne scăzut, comparativ cu titrul Ac față de alți patogeni. Testul ELISA pentru detectarea Ac specifici poate să ofere un rezultat fals negativ. Diagnosticarea rapidă a infecției cu HIV, se face folosind tehnica PCR pentru detectarea ADN proviral sau metoda ELISA pentru detectarea proteinelor HIV.

Imunitatea mediată celular anti-HIV se detectează foarte timpuriu după infecție (în cea de a II-a săptămână) şi este dominată de numărul mare de limfocite TCD_8, al căror număr creşte de 10–20 de ori față de valorile normale (200–600/µl). Raportul limfocitelor CD_4/CD_8 (valoarea normală este 2/1) se inversează. Limfocitele TCD_8 lizează specific celulele infectate cu HIV, care expun proteinele *env* (SU şi TM) la nivelul membranei.

Limfocitele TCD_8 diminuează viremia primară, atât prin efect citotoxic direct asupra limfocitelor T CD_4 infectate, cât şi prin efect represor indirect, mediat de *citokine*. În stadiul timpuriu al infecției, creşte nivelul TNF, IL-1, IL-2, IL-6 şi IFN γ.

Celulele NK au rolul de a liza celulele țintă prin mecanismul ADCC. Activitatea lor este influențată negativ de infecția cu HIV. Proteina *Tat* extracelulară, eliberată de celulele infectate, poate să interfere cu citotoxicitatea naturală a celulelor NK asupra țintei: *Tat* se leagă de canalele de Ca^{2+} ale celulei NK şi inhibă calea de semnalizare care declanşează degranularea.

Amplitudinea infecției primare este parțial represată de efectorii imunitari, simptomele diminuează şi viremia scade. Numeroase clone de CTL se *pierd* datorită stimulării antigenice masive. Deşi energic, răspunsul imun humoral şi celular nu elimină complet virusul liber şi nu lizează toate celulele infectate, pentru că epitopii antigenici virali sunt inaccesibili.

Chiar dacă epitopii sunt accesibili, *variația antigenică* a spiculelor virale, face imposibilă recunoaşterea de către Ac. Pe măsură ce infecția progresează, treptat se selectează noi *variante antigenice* virale, complet rezistente la acțiunea Ac.

Răspunsul imun primar, humoral şi celular represează multiplicarea virală, dar nu elimină complet virusul şi nici celulele infectate. Organismul nu se sterilizează deoarece anticorpii specifici anti-HIV, produşi în timpul infecției primare, nu au activitate neutralizantă optimă. Răspunsul imun primar este neadecvat, fie cantitativ, fie calitativ. O proporție importantă a virionilor rămân infecțioşi. Ineficiența anticorpilor este explicată prin *glicozilarea* excesivă a gp120 (circa 24 de situsuri, pe o secvență de 481 aminoacizi). Grupările glucidice maschează epitopii antigenici şi împiedică neutralizarea virusului. Rămân multe celule infectate, în special în ganglionii limfatici, atât limfocite, cât şi celulele foliculare dendritice.

În esență, persistența infecției cu HIV şi imunodeficiența ulterioară sunt expresia incapacității organismului de a neutraliza virionii în timpul fazei acute a infecției.

În *faza cronică* a infecției, se sintetizează Ac corespunzători RIS, care suferă *fenomenul maturării de afinitate*, se leagă mai eficient de epitopi, având probabil efect neutralizant. Neutralizarea implică legarea Ac de glicoproteinele învelişului, urmată de desprinderea gp 120. Anticorpii neutralizanți, având afinitate mai mare de legare cu epitopii virali, *stimulează* procesul infecțios, deoarece complexul Ag-Ac este recunoscut de macrofage prin intermediul receptorului pentru Fc sau pentru C_3.

Latența clinică corespunde perioadei de *infecție cronică productivă*, dar simptomele SIDA lipsesc. Latența are o durată variabilă: de la *câteva luni, până la 16 ani*[*].

[*] Durata ei este anticipată de încărcătura virală la 6 luni după infecție: pacienții cu mai puțin de 10^5 ARN HIV/ml de plasmă supraviețuiesc cel puțin 5 ani înainte de faza clinică; cei care au mai mult de 10^5 ARN HIV/ml vor avea o latență clinică mai scurtă.

Virusul diseminat sistemic infectează tot mai multe celule T în organele limfoide secundare şi titrul viral sanguin creşte progresiv. Zilnic se eliberează circa 10^9–10^{11} virioni. Proporția limfocitelor

producătoare de virus este de 1/40. În perioada latenței clinice, cantitatea de ARN în plasmă atinge 10^7 copii ARN HIV/ml, echivalent cu 5 x 10^6 virioni/ml. Virusul se multiplică cu o rată înaltă de erori, pe măsură ce celulele infectate devin permisive. Ac specifici şi CTL mențin viremia la un nivel scăzut şi semnele clinice nu apar.

Răspunsul celulelor T. Activarea celulelor T de către Ag nonself implică prezentarea epitopilor în asociație cu moleculele CMH I şi CMH II. HIV-1 activează celulele T prin interacțiunea directă a gp 120 cu CD_4. Ca urmare a interacțiunii, miliarde de limfocite TCD_4 (2 x 10^9) sunt lizate zilnic. Numărul lor scade progresiv, deoarece pierderea nu este compensată integral de producția medulară. Cauza principală a morții limfocitelor TCD_4 este *liza* consecutivă infecției cu HIV, deoarece proteinele virale au efect toxic. Legarea HIV sau a gp 120 de membrana limfocitului induce creşterea volumului celular şi pierderea echilibrului hidroelectrolitic. Aceste modificări s-au reprodus *in vitro* cu gp 120. Efectul toxic al gp 120 este reversat de antagoniştii canalelor de Ca^{2+}, utilizați în clinică pentru a atenua anomaliile neurologice consecutive infecției cu HIV.

O proporție semnificativă de limfocite, după legarea gp 120 la CD_4, se sinucid prin *apoptoză* (activarea programului genetic al morții) sau prin interacțiunea ligandului Fas cu receptorul Fas. O altă cauză a ID o constituie *anergia* limfocitelor, definită de incapacitatea limfocitelor de a secreta IL-2 consecutiv stimulării pe calea RCT. Glicoproteina 120 asociată necovalent cu gp 41, sintetizată în exces, este uşor eliberată de pe suprafața celulei şi a învelişului viral, circulă liberă în sânge, este preluată de CPA şi prezentată RCT, blocând reactivitatea limfocitelor. Starea de anergie poate fi reversată sub acțiunea stimulatoare a IL-2. Complexele imune gp 120- anti gp 120 s-au identificat pe suprafața limfocitelor, la pacienții infectați cu HIV.

Infecția macrofagelor are rol determinant pentru patogeneza HIV-1. *In vivo* este infectat un număr mic de monocite, dar ele formează un rezervor de virus infecțios pentru că rămân viabile o lungă perioadă de timp după infecție. Tulpinile care infectează macrofagele se transmit mai uşor prin placentă şi prin contactul sexual şi produc scăderea mai rapidă a limfocitelor TCD_4.

Monocitele şi celulele TCD_4 au acelaşi receptor CD_4, dar tabloul citokinelor eliberate este diferit.

Gp 41 este implicată în activarea C, dar proteinele C nu lizează virionii HIV-1. Virionii tapetați cu proteinele C au o infecțiozitate superioară, deoarece virusul pătrunde în celulă prin intermediul receptorilor pentru C. Localizarea HIV-1 pe suprafața CDF este dependentă de interacția C cu receptorii pentru C.

Imunodeficiența consecutivă infecției cu HIV.

Imunopatogeneza infecției cu HIV-1, asociată cu imunosupresia severă, paradoxal, se instituie odată cu activarea răspunsului imun. Stimularea sistemului imunitar la pacienții SIDA este demonstrată de nivelul crescut al citokinelor proinflamatorii: IL-1, IL-6, GM-CSF, TNFα, TNFβ, în ser şi în LCR.

Scăderea amplă a numărului de limfocite TCD_4, detectabilă în testul transformării blastice cu mitogene, anulează funcția lor reglatoare asupra funcției imunitare. Limfocitele viabile asigură persistența infecției. Diminuarea sintezei IL-2 încetineşte proliferarea şi diferențierea limfocitelor Tc. În absența celulelor Tc activate, multiplicarea virală este necontrolată. Consecutiv scăderii sintezei IL-2 diminuează activitatea macrofagelor şi a celulelor NK.

Evoluția tipică a infecției se manifestă la 70–80% dintre cei infectați. Perioada de latență este asociată cu un număr de peste 500 limfocite $TCD_4/\mu l$.

HIV nu se multiplică în *limfocitele B*, dar activitatea lor este perturbată sever. Numărul celulelor B diminuează drastic, datorită epuizării clonale. Proteina 120 se leagă de Ig membranară şi acționează ca un *superantigen*, producând *activarea policlonală*, nespecifică, a celulelor B. Titrul Ac (IgG şi IgA) este de circa 10 ori mai mare decât valorile normale, dar numai 20% dintre ei au specificitate anti-HIV. Restul nu sunt protectori nici față de alți agenți patogeni sau potențial patogeni. Celulele B ale pacienților SIDA sunt deficiente în capacitatea de a sintetiza Ac specifici față de diferite Ag. Explicația creşterii titrului Ac este că, în absența limfocitelor TCD_4, celulele Ts nu-şi îndeplinesc rolul fiziologic de a supresa activarea policlonală a limfocitelor B, diferențierea şi sinteza Ig.

Latența clinică *se încheie* când SI nu mai elimină agenții patogeni oportuniști. Titrul Ac anti-HIV şi numărul limfocitelor TCD_8 scad, gp virală 24 reapare în sânge (ca şi în perioada acută a

infecției), titrul viral crește mult. Rețeaua CDF în ganglioni este înlocuită cu un infiltrat de fibroblaste sau de celule grase. Virusul captat anterior pe suprafața CFD este eliberat și viremia crește, iar numărul celulelor TCD_4 scade sub 200/mm^3 de sânge. Capacitatea de RI scade sever.

Manifestarea clinică a SIDA este marcată de apariția *infecțiilor oportuniste* și este asociată cu scăderea numărului de limfocite TCD_4 circulante la valori mai mici de 200/µl. Uneori, progresia maladiei este asociată cu selecția tulpinilor mai virulente, ce utilizează receptorul pentru chemokine.

Imunodeficiența gravă este consecința directă a scăderii dramatice a numărului de limfocite TCD_4 circulante, de la circa 1000 la 100/µl. Proporția limfocitelor producătoare de virus în stadiul avansat este 1/10.

Stadiul clinic al infecției este dominat de efectele TNF, un activator al genomului HIV integrat și inductor al stării caşectice. Caşexia favorizează deteriorarea activității SNC. *In vitro*, IL-1, TNF și IL-6 induc proliferarea sarcomului Kaposi și favorizează multiplicarea HIV în celulele sanguine periferice.

Se pare că HIV pătrunde în SNC curând după infecție. În stadiile tardive ale infecției, în creier s-a evidențiat un număr mare de celule *microgliale* infectate cu HIV. Infecția SNC este asociată cu anomalii neurologice de diferite grade, comune (la 40–90% dintre pacienți): encefalopatie, neuropatie periferică, iar cea mai gravă este complexul SIDA demențial (sindromul HAD = HIV associated dementia). Virusul este transportat în creier, prin monocitele infectate care depășesc bariera sânge-creier și eliberează citokine toxice pentru neuroni. În creier, celulele infectate sunt monocitele și microglia. HIV intră în microglie pe calea CD_4 și a co-receptorilor pentru chemokine CCR_3, CCR_5 și $CXCR_4$, cel mai important fiind CCR_5. *În vitro*, HIV-1 poate infecta linii celulare CD_4^-, probabil prin intermediul galactocerebrozidei (Gal C). Microglia infectată nu este lizată de multiplicarea virală, constituie un rezervor de virus și eliberează neurotoxine: compuși icozanoidici, PAF, TNF-α, IL-1β, IL-6, NO, care induc apoptoza neuronilor.

În esență, SIDA constă în aceea că, în absența unui răspuns imun specific humoral și celular, bolnavul face infecții repetate și tot mai grave cu virusuri și cu microorganisme oportuniste, care în condițiile unei reactivități imunitare normale sunt inofensive. Tuberculoza este cauza mortalității consecutive infecției cu HIV în țările în curs de dezvoltare, iar pneumonia cu *Pneumocystis carinii*, în țările dezvoltate. Când numărul limfocitelor scade sub 50/mm^3, în absența terapiei, moartea este iminentă.

Uneori, la bolnavii SIDA apar malignități: cel mai comun este sindromul Kaposi, ce se manifestă prin apariția nodulilor vasculari multipli în vasele din tegument și din viscere.

La copiii infectați perinatal, în primii ani, SIDA evoluează rapid deoarece sistemul lor imunitar este imatur și au prognostic rezervat.

Tropismul acestui virus pentru limfocitele CD_4, pe care le infectează și le lizează, reprezintă o *experiență a naturii*, care a confirmat rolul fundamental al limfocitelor CD_4, ca elemente reglatoare esențiale ale reactivității imunitare. SIDA reproduce tabloul clinic al sindromului de epuizare (''wasting disease''), care se instalează după timectomia neonatală la animale, descris de R. Good(1962).

Sensibilitatea la infecție și timpul de progresie a infecției cu HIV la maladia SIDA variază mult datorită variației genetice a virusului și a gazdei:

- unele tulpini virale sunt atenuate în mod natural și progresia maladiei este mai lentă;
- tipul HLA ale gazdei poate fi important: homozigoția moleculelor HLA I este asociată cu progresia mai rapidă. Diferitele tipuri de HLA sunt asociate cu prognoze diferite: HLA-B57 și HLA B27, cu progresie mai lentă, iar HLA B35, cu progresie mai rapidă.

Cazurile de rezistență la infecția cu HIV sunt rare și se datorează unei mutații în receptorul R5 al chemokinei CC cu rol de co-receptor pentru pătrunderea HIV în limfocitele TCD_4. Rezistența este asociată cu deleția parțială a CCR_5 la $CCR_5\delta32$*, care excizează 32 nucleotide din secvența genei și introduce schimbarea cadrului de citire, cu sinteza unei proteine nefuncționale.

* Studiul a 1955 indivizi cu CCR5 homomozigoți (++) sau heterozigoți (+ –) a evidențiat că au fost HIV pozitivi. Nici unul (0 din 17) dintre cei CCR5δ32 nu a fost HIV pozitiv. Cei heterozigoți progresează mai lent (cu 2–3 ani) spre stadiul clinic al bolii. Concluzia este că CCR5δ32 este o alelă care conferă protecție solidă anti-HIV.

Foarte interesanți pentru cercetători sunt două grupe mici de indivizi:

– indivizii cu *infecție HIV pe termen lung,* dar maladia nu progresează. Virusul se multiplică cu o rată scăzută. Serul conține mai puțin de 50 de copii de ARN/ml. Factorii genetici ai gazdei, controlul imunologic al multiplicării și/sau infecția cu o tulpină atenuată de HIV pot să explice acest tip de infecție;

– indivizii *seronegativi*, cu expunere repetată la antigenele HIV, dar nu fac maladia și nu au viremie detectabilă. Indivizii, probabil, au limfocite TCD_8 specifice pentru antigenele virale dintr-o expunere anterioară la antigene care dau reacție încrucișată cu antigenele HIV. Sunt foarte interesanți pentru dezvoltarea unui vaccin.

Persoanele care pierd ambele alele codificatoare ale co-receptorului CCR_5 sunt virtual imune la infecție.

Transmiterea se face pe următoarele căi:

– contactul hetero- sau homosexual;

– prin sânge și derivatele lui;

– prin acele și seringile contaminate, în special la cei care își injectează iv droguri;

– pe verticală, de la mamă la făt în timpul vieții intrauterine sau la naștere. Mai puțin de 20% dintre copiii născuți de mame HIV pozitive se nasc HIV pozitivi. Anticorpii materni anti-HIV traversează placenta, iar testul pozitiv la un copil nu indică infecția;

– transmiterea verticală, după naștere prin secreția lactată.

Nu toate fluidele transmit infecția, deoarece titrul viral variază considerabil.

Diagnosticul. Metoda curentă de determinare a infecției cu HIV este cea *serologică*, ce constă în evidențierea Ac specifici în ser, într-o reacție cu antigenele HIV din trusa ELISA. Testele ELISA comerciale sunt sensibile și specifice, cu puține rezultate fals pozitive sau fals negative. Anticorpii anti-HIV se evidențiază cu antiglobulina umană cuplată cu o enzimă. Antigenul HIV este un amestec de proteine recombinante (p41, p24) sau peptide sintetice ale epitopilor dominanți.

O altă variantă serologică utilizează microparticule tapetate cu antigene HIV brute inactivate. În prezența Ac specifici, microparticulele aglutinează.

Testul parcurge 3 etape:

a) Ac antiHIV din serul cercetat se leagă de Ag HIV, fixat în suportul test;

b) Ac legați sunt evidențiați cu IgG de iepure anti-IgG umană, marcat cu enzimă;

c) În prezența Ac anti-HIV, enzima formează un produs colorat de reacție.

Testul EIA are sensibilitate și specificitate de peste 98%. Testul pozitiv trebuie să fie confirmat prin testul western blott sau un test specific de imunofluorescență, care evidențiază Ac anti-p24, anti-p41, anti-p120, anti-p160. Seroconversia are loc la 3–4 săptămâni. Majoritatea pacienților au Ac detectabili în 6–12 săptămâni. Virtual, toți pacienții se pozitivează la 6 luni. Extrem de rar, testul Ac rămâne negativ chiar la 6 luni.

Metode *moleculare:* PCR se folosește pentru detectarea ADN proviral, iar RT-PCR pentru detectarea ARN viral.

Diagnosticul timpuriu, înainte de sinteza Ac (seroconversie), al infecției cu HIV constă în detectarea ADN proviral în celulele sanguine sau în alte celule prin metoda amplificării genice (PCR).

Evaluarea încărcăturii virale a plasmei (viremie) este importantă pentru monitorizarea tratamentului antiviral. Metoda de măsurare a viremiei, pentru diagnosticul de rutină, constă în extracția ARN din virioni, prepararea ADNc și amplificarea prin metoda PCR (RT-PCR).

Diagnosticul *neonatal* se bazează pe detectarea acizilor nucleici prin PCR sau a Ag viral prin metoda ELISA.

Cultivare. HIV se izolează din fluidele și din celulele tractului genital: lichidul spermatic, secrețiile vaginale; din limfocite, plasmă, LCR, lacrimi, salivă, urină și din secreția lactată. În tractul genital, virusul răspunde foarte puțin terapiei antivirale. *In vitro,* HIV se multiplică, de obicei, în celulele originare de la gazda naturală sau de la specii strâns înrudite. HIV poate fi propagat pe termen scurt în culturi de celule TCD_4 și de mononucleare sanguine stimulate cu PHA și IL-2.

Tulpinile Sin se adaptează și se multiplică în liniile TCD_4 imortalizate, care devin producătoare cronice de virus. Tulpinile NSin se multiplică cu randament scăzut în celulele mononucleate separate din sângele periferic (PBMC).

In vitro, HIV infectează celule CD_4^-: astroglia, neuronii, celulele derivate din carcinomul colorectal, celule precursoare din măduva osoasă, hepatoma, glioma, neuroblastoma. Infecția acestor celule de către HIV este mai puțin eficientă decât a celulelor limfoide CD_4^+.

HIV se poate cultiva din limfocitele periferice. Numărul celulelor infectate variază în funcție de stadiul infecției. Titrul viral înalt se găsește în plasma și în celulele sanguine periferice la pacienții cu sindromul clinic. Cea mai sensibilă metodă de izolare a virusului este de a *co-cultiva* proba de analizat, cu celulele mononucleare neinfectate din sângele periferic, stimulate cu mitogen. Izolatele primare de HIV se multiplică foarte lent, comparativ cu tulpinile adaptate *in vitro*. Multiplicarea virală se detectează prin testarea supernatantului culturii, după 7–14 zile, pentru RT sau pentru antigenele virale. Majoritatea persoanelor pozitive pentru Ac anti-HIV, au și virus circulant ce poate fi cultivat din sânge. Metoda fiind laborioasă și costisitoare se folosește în laboratorul de cercetare și nu pentru diagnosticul de rutină a infecției cu HIV.

Obținerea *vaccinului* ridică dificultăți majore pentru că virusul suferă mutații rapide și nu se exprimă în toate celulele infectate. Izolatele de HIV, chiar cele succesive de la același pacient, sunt foarte variabile din punct de vedere antigenic. Diferențele antigenice se manifestă în special pentru antigenele glicoproteinelor de înveliș. Variația, reflectă probabil apariția mutantelor rezistente la neutralizare. Pe de altă parte, în organismul infectat, virusul se propagă atât ca virus liber, cât și prin contactul intercelular, fără ca virionii să se expună contactului cu efectorii RI. Un vaccin eficient trebuie să stimuleze IMH și IMC protectoare și să protejeze organismul de infecția cu variatele subtipuri antigenice.

În absența măsurilor de control, singura cale de a evita răspândirea epidemică a HIV este eliminarea factorilor de risc: sângele se testează pentru prezența Ac. Infecția este transmisă chiar de pacienții asimptomatici, prin sânge sau prin contact sexual. Persoanele pozitive nu donează sânge, organe, țesuturi, spermă.

Alte retravirusuri limfotrope. HTLV I și II (*H*uman *T L*ymphotropic *V*irus), BLV (*B*ovine *L*eukemia *V*irus), la care se adaugă virusuri simiene cu tropism pentru limfocitele T, formează un grup de agenți infecțioși strâns înrudiți.

HTLV I, descoperit de R. Gallo (1980) într-o linie de celule T transformate, derivate de la un pacient cu leucemie, produce infecții, de obicei asimptomatice, dar este asociat cu maladii inflamatorii și cu ATLL (adult T leukaemia / limphoma). Celulele ATLL sunt CD_3^+, CD_4^+ și CD_{25}^+ (receptorul pentru IL-2). În forma leucemică apar celule caracteristice polilobate. Celulele malignizate sunt mature, dar neoplazia este foarte agresivă.

Patologia asociată cu HTLV II este puțin cunoscută, dar virusul s-a izolat din celulele leucemiei păroase. Acestea sunt de regulă, limfocite B. HTLV II imortalizează celulele T *in vitro*, dar nu se cunosc proprietățile sale oncogene.

HTLV I și II sunt virusuri de tip C și se multiplică în linii celulare imortalizate obținute de la pacienți.

Infecția celulelor T *in vitro* necesită co-cultivarea cu o linie celulară producătoare de HTLV și tratamentul cu mitomicină C.

HTLV I și II se transmit numai prin intermediul celulelor infectate (transfuzie sanguină, prin limfocitele din laptele matern și prin contact sexual, dar nu prin plasmă sau prin alte fracții acelulare). *In vitro*, celulele sensibile formează sincitii la contactul cu celulele producătoare de virus.

BLV produce leucemia limfocitelor B la o proporție mică dintre bovinele infectate

Retravirusurile *aviare* se transmit congenital prin infecția cu virusul excretat din oviduct în albumină. Virusul se transmite pe verticală prin genomul integrat în linia germinală. Celulele somatice și germinale ale puilor de găină poartă genomul viral complet sau cu defect de multiplicare. Fiecare celulă poartă 5–30 genomuri virale integrate, denumite locusuri virale endogene. Unele au capacitatea să devină exogene și implicit transmisibile pe orizontală. Retravirusurile defective endogene se pot exprima numai dacă funcțiile genice defective sunt suplinite de un virus helper suprainfectant, fenomen denumit complementație. Virusul endogen poate fi indus de radiația x, de agenți chimici (pirimidine halogenate).

Virusurile endogene sunt secvenţe de ADN înrudite cu retravirusurile exogene, netranscrise în mod obişnuit, sunt moştenite în linia germinală probabil a tuturor vertebratelor, unde se comportă ca gene mendeliene stabile. În genomul vertebratelor sunt circa 1000–2000 de copii de provirusuri endogene sau elemente provirus-like, majoritatea cu structura caracteristică a secvenţelor LTR, rămăşiţe ale retravirusurilor infecţioase.

Virusurile endogene pot fi copii complete ale provirusului ADN, dar în mod obişnuit nu se manifestă ca particule virale infecţioase, deoarece nu realizează un ciclu complet de multiplicare. Ciclul de multiplicare şi asamblarea virionilor pot fi induse de raze x, pirimidine halogenate, inhibitori ai sintezei proteice, citokine proinflamatorii, hormoni steroizi, când virusurile endogene se exprimă ca virioni completi, infectioşi.

Agenţii chimici (5-azacytidina) reversează metilarea ADN şi induc expresia, cel puţin tranzitorie, a provirusurilor endogene. De exemplu, şoarecii AKR devin viremici.

Provirusurile endogene, cu excepţia MMTV, nu sunt patogene şi sunt mai puţin eficiente în ciclul multiplicării, comparativ cu cele exogene.

În stare latentă, provirusurile endogene pot fi considerate ca *elemente genetice egoiste*, care au derivat cu mare probabilitate din infecţiile cu virusuri exogene, dar s-au adaptat la rezidenţa în linia germinativă.

Probabil 5–10% din totalul genelor mamaliene sunt dobândite prin mecanismul transcrierii inverse. Unele dintre elementele provirus-like, denumite *retrotranspozoni*, adeseori transpozează sau se rearanjează via reverstranscrierii ARNm: de exemplu, transpozonii levurilor şi unele elemente genetice ale plantelor sunt mobile în interiorul genomului, prin mecanismul reverstranscrierii. Retrotranspozonii se deosebesc de retravirusurile exogene, prin absenţa fazei de virion.

Retrotranspozonii sunt o sursă continuă de transpoziţie genică şi mutageneză prin inserţie şi sunt un rezervor al LTR, care sunt activatori potenţiali ai transcrierii.

Retravirusurile acţionează ca agenţi transductori, se comportă ca mutageni prin inserţie, induc o varietate de neoplazii şi pot fi agenţi cauzatori ai multor imunodeficienţe, ai unor maladii autoimune (artrita) şi anemii.

Bibliografie

Atwood W. J., Berger J. R., Kaderman R., Tornatore C. S., Major E. O. 1993. Human Immunodeficiency Virus type 1 infection of the brain – Clin. Microbiol. Rev, vol. 6, pp. 339–366.

Cullen B. R. 1992. Mechanisms of Action of Regulatory Proteins Encoded by Complex Retroviruses. Microbiol. Rev. 56(3): 375–394.

Coffin J. M. 1990. Retroviridae and Their Replication, în vol. Virology, Sec. Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Levy J. A. 1993. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection – Microbiol. Reviews vol. 57, no. 1, pp. 183–289.

Nowak M. A ., McMichael A. J. 1995. How HIV Defeats the Immune System. Sci. Amer, August.

Pantaleo G., Fauci A. S. 1996. Immunopathogenesis of HIV Infections. Annu. Rev. Microbiol. 50, pp. 825–854.

Elder J. H., Phillips T. R. 1995. Feline Immunodeficiency Virus as a Model for Development of Molecular Approaches to Intervention Strategies Against Lentivirus Infections. Adv. in Virus Research, vol. 46. pp. 225–247.

Hirsch M. S., Curran J. 1990. Human Immunodeficiency Viruses. Biology and Medical Aspects, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Wong-Staal F. 1991. Human Immunodeficiency Viruses and Their Replication, în vol. Fundamental Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Urnovitz H. B., Murphy W. H. 1996. Human endogenous retroviruses: nature occurrence and clinical implications in human disease. Clin. Micr. Rev. 9, 72–99.

Bryan Rock R., Gekker G., Hu S, Sheng W.S., Cheeran M., Lokensgard J.R., Peterson P.K. 2004. Role of Microglia in Central Nervous System Infections. Clin. Microbiol. Rev., 17: 942–964.

Chirmule N., Pahwa S. 1996. Envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1: profound influences on immune functions – Microbiol. Rev. 60(2): 386–406.

Bour S., Geleziunas R., Wainberg M. A. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD_4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection – Microbiol. Rev. 59(1): 63–65.

Guntaka R. V. 1993. Transcription termination and polyadenylation in retroviruses – Microbiol. Rev. 57(3): 511–521.

Cullen B. R. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. Microbiol. Rev., 56 (3): 375–394.

Norkin L. 1995. Virus Receptors: Implications for Pathogenesis and Design of Antiviral Agents – Clin. Micr. Reviews 8, 2, pp. 293–315.

Clements J. E., Christine Zink M. 1996. Molecular Biology and Pathogenesis of Animal Lentivirus Infections. Clin. Micr. Reviews 9, 1, p. 100–117.

Mişcalencu D., Mailat F., Mihăescu Gr. 1980. Chicken liver cells in the presence of Rous sarcoma in organism – Rev. Roum. Biol. 25, 1, 51–57.
Weiss R. A., Dalgleish A. G., Loveday C., Pillay D. 2004. Human Immunodeficiency Viruses, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.
Carter J. B., Saunders V. A. 2007. Virology: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Ltd.
Jobling M. A., Hurles M. E., Tyler Smith C. 2004. Human evolutionary genetics, Garland Press.
Taylor G. P. 2004. The Human T Cell lymphotropic Viruses, în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, fifth Edition, ed. by Arie.
Zuckerman J., Banatvala J. E., J. R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

21.19. *Mimivirus*

Etimologic, denumirea vine de la *mi*micking *mi*crobe virus. *Mimivirus* a fost descoperit în 2003 (Scola şi colab.). Prin dimensiuni – 750 nm diametru, prin lungimea genomului – 1,2 milioane bp, prin diversitatea proteinelor codificate – 911 proteine, *Mimivirus* a zdruncinat graniţele care păreau impenetrabile, între virusuri şi organismele parazite intracelular.

În 1992, o epidemie de pneumonie în West Yorkshire (Anglia) a determinat iniţierea investigării *Legionella* în apa din apropierea unui turn de răcire. A fost analizată *Acanthamoeba polyphaga*, în speranţa găsirii *Legionella*, suspectând relaţia ecologică a celor două organisme, dar în citoplasma amoebei s-a evidenţiat, pe imaginile electrono-optice, un parazit asemănător unui coc de dimensiuni mici. Parazitul nu a crescut pe mediile bacteriologice şi nici nu s-au identificat genele pentru sinteza ARNr 16S, markerul genetic cel mai bine conservat la procariote.

Morfologie. Regiunea centrală a virionului este alcătuită dintr-o capsidă icozaedrică şi genomul format din 1,2 milioane pb. Capsida este înconjurată de 2 straturi lipidice, iar la exteriorul acestora, un strat dens de fibre (fig. 438). Natura chimică a fibrelor ce se proiectează din stratul extern al particulei, nu este certă: sunt compuşi colagen-like, legaţi încrucişat într-o reţea densă şi sunt glicozilaţi. Proteinele presupuse că fac parte din stratul de fibre nu s-au detectat în proteomul particulei virale. Probabil legăturile transversale le fac insolubile şi le exclud din EF în gel şi din analiza spectroscopiei de masă. Aceiaşi explicaţie este valabilă şi pentru alte proteine majore ale capsidei, care nu se evidenţiază la analiza proteomică.

Stratul extern al virionului se aseamănă cu peretele celulei bacteriene, ceea ce explică retenţia coloraţiei Gram. Stratul extern mediază interacţia cu amoeba, fagocitoza fiind declanşată atât de dimensiunile mari, cât şi de catenele glucidice. *Mimivirus* este împachetat în stratul extern. Digestia fibrelor stratului extern în vacuola de fagocitoză este o condiţie pentru infecţia productivă. Specificitatea virusului pentru gazda *Acanthamoeba* poate fi datorată prezenţei enzimei ce degradează învelişul de fibre în fagosom.

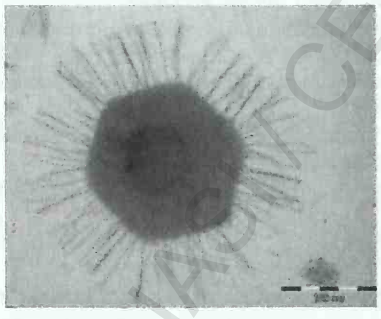


Fig. 438. Structura unei particule de *Mimivirus* în secţiune, la microscopul electronic în transmisie. Capsida de formă hexagonală are simetrie icozaedrică. În regiunea centrală, nucleoidul electrono-dens are aceiaşi formă. La periferie se observă reţeaua de fibrile bine organizată (după Raoult şi colab., 2007).

Unele proteine codificate au funcţii speciale, neîntâlnite la virusuri. Prin complexitatea repertoriului genic (911 proteine codficate) şi prin compoziţia particulei (conţine produsele a peste 130 de gene), *Mimivirus* se distinge de celelalte virusuri.

Genomul este reprezentat de o singură moleculă de ADN dc, cu lungimea de 1.184.404 pb, organizate în 911 gene. Două secvenţe inversate de circa 900 nt aproape de ambele extremităţi sugerează că genomul poate adopta topologie circulară. Circa 1/3 dintre gene au cel puţin un paralog – gene asemănătoare – rezultate prin duplicare. În structura genomului se găsesc gene ce codifică componente centrale ale aparatului de transcriere şi de traducere, considerate specifice organismelor celulare: genele ce codifică ARNt-sintetazele.

Secvenţierea genomului a evidenţiat asemănarea filogenetică a *Mimivirus* cu virusurile ADN mari nucleo-citoplasmatice (NCLDV), un grup în care sunt incluse *Pox-*, *Phycodna-* (infectează algele), *Irido-* (infectează peştii), *Asfarviridae*.

Noul virus (*A. polyphaga Mimivirus*) nu trece prin porii filtrului de 0,3 μm, o procedură experimentală obişnuită pentru separarea bacteriilor de virusuri.

După infecţia experimentală a culturii de *A. polyphaga, Mimivirus* are un ciclu de multiplicare tipic viral: faza de eclipsă (5 h după infecţie), urmată de apariţia virionilor progeni, care treptat ocupă cea mai mare parte a volumului citoplasmei. Celula amoebiană începe să se lizeze la 14 ore după infecţie şi eliberează circa 300 virioni progeni. Ciclul de multiplicare este citoplasmatic.

Mimivirus rămâne infecţios după un an la temperatura 4–32° în tampon neutru.

Ciclul de multiplicare

- virionii sunt endocitaţi de amoebă în procesul hrănirii;
- în vezicula de endocitoză, stratul de fibrile asemănătoare celor de LPS este parţial digerat, iar suprafaţa capsidei este accesibilă interacţiunii cu membrana vacuolei;
- conţinutul capsidei este eliberat în citoplasmă, probabil prin fuziunea membranei interne lipidice a virionului cu membrana fagosomului. Particula virală nudă este eliberată în citoplasmă;
- transcrierea genelor timpurii şi timpurii-târzii, probabil sub controlul promotorului bine conservat, utilizând aparatul de transcriere codificat şi împachetat de virus.

Mimivirus are o compoziţie chimică complexă:

- un set complet de enzime de reparare a ADN, capabile să corecteze împerecherile greşite ale nucleotidelor, precum şi erorile induse de factori oxidanţi, radiaţia UV, agenţii alkilanţi;
- este singurul virus care codifică 3 tipuri de topoizomeraze (IIa, Ib asemănătoare cu cea de la pox, Ia);
- posedă enzime care modifică polizaharidele, aminoacizii şi lipidele. Lipazele pot fi implicate în ruperea membranei gazdei *Acanthamoeba* şi eliberarea virusului progen;
- *4 aminoacil-ARNt sintetaze* specifice pentru Tyr, Arg, Cys şi Met, considerate ca fiind caracteristice organizării celulare;
- enzimă ce bonetează ARNm;
- mai mulţi factori de iniţiere a sintezei proteinelor;
- 6 gene ce codifică pentru ARNt: 3 $ARNt_{leu}$, $ArNt_{trp}$, $ARNt_{his}$, $ARNt_{cys}$.

Analiza genetică a evidenţiat un promotor foarte bine conservat la 50% dintre gene. Ar fi 2 categorii de gene:

- unele cu promotori recunoscuţi de ARN-pol virală;
- celelalte, fără un promotor conservat, pot fi transcrise de ARN-pol gazdei, recrutată din nucleul amoebei.

Spectrul îngust de gazdă este în conflict cu rapoartele ce sugerează că *Mimi-* poate fi un patogen amoebian ca şi *Legionella* şi ar putea cauza pneumonia la om. Serul unor pacienţi cu pneumonie comunitară sau nosocomială reacţionează încrucişat cu *Mimi-*, iar ADN *Mimi-* s-a găsit în probele respiratorii ale unui pacient cu pneumonie nosocomială. Serul pacienţilor reacţionează cu numeroase proteine de *Mimi-*, cele mai multe fiind unice pentru acest virus, ceea ce face puţin probabilă reacţia încrucişată cu alţi patogeni. *Mimivirus* n-a fost izolat de la pacienţi, dar poate fi considerat ca agent potenţial al pneumoniei.

Bibliografie

Clarence J. M., Abergel C., Ogata H. 2009. Mimivirus – Current Topics in Microbiol. and Immunol., vol. 328, Editor James van Etten, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Claverie J. M. 2008. Mimivirus – în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Raoult D., La Scola B., Birtles R. 2007. The discovery and characterization of Mimivius, the largest known putative virus and putative pneumonia agent. Clin. Infect. Dis. 45: 95–102

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

22. RĂSPUNSUL IMUN ANTIVIRAL

Infecţiile virale constituie, încă, o cauză majoră a morbidităţii şi mortalităţii, deşi vaccinarea a redus incidenţa infecţiilor severe (polio, oreion, rujeolă, rubeolă) şi a eradicat variola. Cunoaşterea mecanismelor răspunsului imun antiviral este importantă pentru evaluarea problemelor clinice de fond (de exemplu, dinamica răspunsului imun) şi pentru căutarea unor noi metode de obţinere a vaccinurilor.

Interacţiunea virusurilor cu organismele este modulată de sistemele de apărare înnăscute şi dobândite. Pentru a se perpetua într-o populaţie, virusul trebuie să fie virulent, dar suficient de flexibil în modularea virulenţei, pentru a se păstra în populaţia sensibilă. In perspectivă evolutivă, interacţiunea virusului cu organismul sensibil trebuie să confere superioritate virusului. Dacă este prea virulent şi nu poate fi controlat de imunitatea gazdei, rezultatul poate fi moartea şi în final dispariţia gazdei. Dacă este lipsit de virulenţă, virusul va fi eliminat prea rapid de sistemul imunitar al gazdei şi poate să dispară prin incapacitatea de a se perpetua.

Adeseori, virulenţa virală este diminuată prin *mutaţie* şi în acelaşi timp se selectează gazde mai bine adaptate imunitar, rezultând un echilibru fluctuant, în care coexistă atât gazda, cât şi virusul.

22. 1. Mecanisme nespecifice (înnăscute) de protecţie antivirală

Imunitatea antivirală înnăscută acţionează rapid, este mediată de bariere *fizice* (tegument, membranele mucoase ale tractului gastro-intestinal, respirator şi urogenital), chimice şi biologice, dar şi de factori genetici (absenţa receptorului pentru un anumit virus: de exemplu, şoarecele nu este sensibil la virusul polio pentru că îi lipsesc receptorii specifici).

Protecţia *chimică* este conferită de secreţia acidă din stomac şi vagin sau de enzime (lizozimul) secretate pe suprafaţa barierelor fizice.

Protecţia biologică este conferită de microbiota rezidentă. Bacteriile produc substanţe antimicrobiene ce inhibă atacul potenţialilor invadatori.

Dacă barierele fizice, chimice şi biologice sunt depăşite, agentul infecţios pătrunde în mediul intern şi intră în acţiune cea de a II-a linie de protecţie reprezentată de macrofage, CD şi neutrofile. Ele fagocitează agentul invadator şi produc IFN.

22.1.1. Imunitatea nespecifică mediată celular

Imunitatea celulară înnăscută antivirală este mediată de *celulele dendritice* (CD), *macrofage* şi *celulele NK*.

Celulele cu rol în apărarea nespecifică recunosc un grup de molecule ale agenţilor infecţioşi cunoscut sub denumirea generică de *tabloul molecular asociat patogenilor* (PAMP = pathogen associated molecular patterns), iar moleculele gazdei ce recunosc structurile patogenilor formează *tabloul receptorilor de recunoaştere* (pattern recognition receptors = PRR). PRR pentru detectarea Ag virale fac parte din familia TLR (Toll like receptors - TLR 3, 4, 7, 8, 9).

TLR se exprimă pe CD şi macrofage, ce au rol în declanşarea RI înnăscut, dar sunt şi CPA pentru iniţierea RI adaptativ. TLR recunosc ARN dc sau ARN mc viral bogat în G şi U al virusurilor influenza şi HIV.

CD preiau Ag la locul infecţiei, se activează, eliberează citokine activatoare ale celulelor tisulare învecinate şi migrează în organele limfoide secundare unde mobilizează celulele T. Se disting

CD *mieloide* (CDm se diferențiază din precursori ai liniei mieloide în MO, ca și monocitele și granulocitele) și CD *plasmocitoide* (CDp se diferențiază din celule precursoare ale liniei limfoide). CDm sunt celulele Langerhans și CD interstițiale. Ambele tipuri de CD sunt activate de infecția virală prin receptorii PAMP, intra- și extracelulari.

CDp activate produc cantități mari IFN-α/β. IFN-α/β produc efecte autocrine și paracrine și activează sinteza proteinelor antivirale care limitează diseminarea virusului.

Celulele NK produc citokine antivirale sau lizează celulele țintă într-o manieră nespecifică față de Ag și nu produc memorie imunitară. Ele se activează rapid și la 2–3 zile după infecție ating activitatea maximă, după care diminuează rapid. Deficiențele pentru celulele NK sunt rare, dar sunt însoțite de infecții severe cu virusul varicela zoster, cu virusul citomegalic sau cu herpes simplex 1.

Mecanismul interacțiunii celulei NK cu celula infectată nu se cunoaște. Celulele NK recunosc și lizează celulele care au pierdut moleculele CMH. Activitatea lor este stimulată de IFN.

Moartea celulei țintă survine ca urmare a exocitozei granulelor citotoxice. Celulele NK controlează multiplicarea arena-, paramixo-, HIV, herpes. Activitatea lor este reglată prin semnale pozitive și negative, al căror echilibru determină activarea sau inhibiția celulei NK la contactul cu ținta.

Fagocitele mononucleare (monocitul, macrofagul tisular, CD) au rol important în eliminarea virusului dintr-un proces infecțios, deoarece captează virionii inoculați experimental, iar macrofagele au și activitate ADCC.

Celulele imunității înnăscute și adaptative sunt corelate funcțional: pe suprafața lor se găsesc receptori TLR, puntea de legătură prin care cele două sisteme celulare cooperează și secretă citokine cu efecte sinergice.

Dacă sistemul protector înnăscut nu stopează diseminarea agentului infecțios, este activat *sistemul imunitar adaptativ.*

22.1.2. Interferonii și mecanismele acțiunii lor

Interferonii (IFN) sunt o categorie specială de *citokine*, a căror sinteză este indusă de diferiți agenți chimici sau biologici. Funcțiile lor se caracterizează printr-un spectru larg de activități nespecifice, cea mai importantă fiind *inducția stării antivirale.*

Interferonul a fost descoperit de Isaacs și Lindenmann (1957). Ei au observat că injectarea membranei corioalantoice a embrionului de găină, cu virus influenza inactivat (denumit virus *inductor* sau *interferent*), blochează multiplicarea ulterioară a virusului influenza infecțios (virus *revelator* al interferenței). Autorii au arătat că inhibiția multiplicării virale (interferența) se datorează unui factor inhibitor, pe care l-au denumit *interferon.*

Inducerea stării antivirale este cea mai importantă funcție a IFN, dar ei au și alte activități biologice majore:

- inhibă multiplicarea celulelor normale și tumorale;
- reglează procesele de diferențiere celulară;
- reglează funcția imunitară.

Natura IFN. Toți IFN se sintetizează ca precursori de 166 aminoacizi, cu secvențe semnal N-terminale de 20-23 aminoacizi, necesare secreției. Dimensiunle reale ale catenei polipeptidice sunt de 143, 145 și respectiv de 146 resturi de aminoacizi. Molecula de IFN are două domenii cu secvențe de aminoacizi relativ constante: unul în jumătatea N-terminală, care formează *situsul de legare B* (*binding*) pe receptorul celular, iar celălalt, *A* (*activity*), în jumătatea C-terminală, pare să moduleze legarea de receptor și probabil mediază funcțiile biologice.

Unii IFN pot fi modificați post-traducere prin glicozilare N și O. Interferonii sintetizați de diferite specii de organisme sau de diferite tipuri de celule ale unui organism, prezintă deosebiri ale secvenței aminoacizilor, ale conținutului glucidic și implicit antigenice, care au stat la baza grupării lor în două *tipuri*: *I* și *II*. Antiserul specific față de moleculele de IFN ale unui tip nu precipită și nu neutralizează acțiunea IFN celuilalt tip.

Interferonii de tip I cuprind variantele α, β și *t*, iar cei de tip II includ varianta moleculară *γ*.

IFN α este produs de *leucocite,* inclusiv de *celulele B activate* și este reprezentat de o varietate largă de molecule, codificate de un număr mare de gene. Cele 14 gene codificatoare ale sintezei IFNα

localizate pe brațul scurt al perechii 9 de cromosomi, pot fi împărțite în 2 grupe: o genă de răspuns imediat, indusă rapid, fără să necesite sinteză proteică prealabilă și un set de gene α (2, 5, 6, 8) care sunt induse tardiv și necesită sinteză proteică. Celulele producătoare de IFN α în condiții naturale, sunt precursoare ale celulelor dendritice.

IFN β este sintetizat de variate celule *fibroblastele* infectate cu virus sau stimulate cu ARN dc și de alte țesuturi activate. Sinteza sa este codificată de *o singură genă,* localizată pe brațul scurt al perechii 9 de cromosomi. Interferonul *t,* s-a identificat la bovine și la ovine și este sintetizat în cantități mari în epiteliul uterin, în perioada care precede implantarea embrionului și de aceea s-a denumit IFN trofoblastic.

IFN-α și IFN-β au efecte antivirale asemănătoare și antiproliferative asupra celulelor imunitare și neimunitare.

IFN γ, codificat de o genă localizată pe perechea 12 de cromosomi, singura genă cu introni, este produs de *limfocitele activate* sub acțiunea antigenului specific sau a substanțelor mitogene, de celulele TCD_8^+, NK și reprezintă *IFN de tip II.* Deoarece, *in vivo,* este sintetizat de *limfocitele T activate* și de celulele NK, IFN γ este considerat a fi *de tip imun.*

IFNγ este stimulator al RI, dar este mai puțin antiviral, comparativ cu IFN-α și β.

În general, moleculele de IFN sunt *glicoproteine.* Interferonii α și β au resturi glucidice legate la Asp 80 și respectiv 25 și 97. Majoritatea IFN α nu sunt glicozilați. Glicozilarea nu este esențială pentru exprimarea activităților biologice, ceea ce explică faptul că IFN sintetizați de celulele bacteriene în care s-au clonat genele codificatoare, au activitate biologică.

Interferonii α și β sunt stabili chiar la pH 2 și își păstrează activitatea în prezența SDS, ultima fiind o proprietate foarte importantă pentru purificare.

Inductorii sintezei IFN. In mod obișnuit, celulele normale nu sintetizează cantități detectabile de IFN. Genele codificatoare ale sintezei lor nu sunt transcrise. Sinteza IFN este indusă de diferiți agenți infecțioși: virusuri infecțioase sau inactivate, moleculele de ARN dc helicale, micoplasme, rickettsii și chlamidii, polimerii sintetici, mananii, diferiți activatori metabolici etc. LPS este un bun inductor al IFN α și β.

Pentru virusurile cu genom ARN dc, inductorul sintezei de IFN este chiar genomul viral. Virusurile cu genom ADN, cu excepția celor din grupul pox, sunt slab inductoare, iar cele cu genom ARN mc sunt inductoare ale sintezei IFN, deoarece ARN se replică printr-un intermediar dc.

ARN mc, ADN mc sau dc, ca și hibrizii ADN-ARN nu sunt inductori ai sintezei IFN.

Virusurile inactivate (din vaccinuri), ca și cele ce infectează un substrat nepermisiv sunt inductoare ale sintezei IFN. In leucocitele mononucleate, sinteza IFN este indusă de glicoproteinele învelișului viral.

In vitro, la 37°, sinteza începe la 4 ore după infecția virală și atinge rata maximă concomitent cu sinteza proteinelor virale.

Cel mai bun inductor al sintezei de IFN este ARN dc natural sau sintetic. Mecanismul inducției nu este cunoscut. Probabil, ARN dc induce sinteza unui factor, care, la rândul său neutralizează represorul specific al transcrierii acestor gene. Factorul determinant al inducției este însăși natura bicatenară a moleculei de ARN și nu informația genetică înscrisă în ea. Nu se cunoaște nici mecanismul inducției sintezei IFN γ, în limfocitele activate de antigenul specific sau stimulate de mitogene. Moleculele de ARN dc sau infecțiile virale induc sinteza IFN de tip I (α și β).

Inducția sintezei IFN necesită sinteza ARNm și traducerea sa în catena polipeptidică. Inhibitorii sintezei proteinelor (actinomicina D), administrați simultan cu inductorul, inhibă sinteza IFN. Interferonii se sintetizează, probabil, la toate clasele de vertebrate.

Studiul biochimic al moleculei de IFN a fost ușurat de obținerea AMC specifici față de diferite tipuri de IFN.

Activități biologice efectoare ale interferonilor

Activitatea biologică principală a IFN este cea antivirală și a fost demonstrată experimental. Infecțiile virale sunt mult mai severe la animalele de experiență, cărora, odată cu virusul infecțios li s-a injectat ser imun specific anti-IFN.

Descoperirea IFN a condus la revizuirea conceptului imunității celulare şi a rolului său în limitarea infecțiilor virale. Interferonii formează prima linie de apărare umorală față de infecțiile virale, înainte de mobilizarea răspunsului imun. Sistemul *IFN este primul care își exercită efectul protector*, fiind operativ în decurs de *câteva ore* de la infecție. IFN nu au acțiune antivirală directă, ci *induc o stare antivirală* în celulele neinfectate. Interferonii protejează celulele de efectele citopatice virale, dar nu elimină complet infecția. Starea de protecție antivirală, indusă de IFN durează câteva zile şi apoi dispare. După câteva zile de absență, starea de protecție poate fi indusă din nou.

Interferonii au specificitate de specie, adică activitățile biologice se manifestă față de orice virus, în raport cu celulele speciei care a produs IFN. Baza specificității de acțiune rezidă în *interacțiunea dintre IFN* şi *receptorul celular*. Activitatea biologică a IFN este direct proporțională cu afinitatea lor de legare cu substratul celular. Interferonul de şoarece are, *in vitro*, efect protector față de celulele de şoarece, indiferent de virusul infectant. Acelaşi IFN are un efect protector minim (5%) pentru celulele de şobolan, iar pentru celulele umane, efectul protector este nul.

Protecția antivirală este dependentă de concentrația IFN. Dozele mari, administrate în sisteme experimentale, *in vitro*, sunt protectoare față de nivelul scăzut al multiplicității de infecție, asemănător celui natural. Multiplicitatea înaltă de infecție depăşeşte efectul protector al IFN.

Cele mai multe virusuri sunt inductoare ale sintezei IFN şi sunt sensibile, în diferite grade, la acțiunea lui. Interferonul este produs de celulele infectate, concomitent cu desfăşurarea ciclului multiplicării virale, este eliberat din celule imediat după sinteză şi difuzează spre celulele învecinate neinfectate, cărora le induce *starea antivirală*. Astfel, virusul, în ciclul de multiplicare, întâlneşte o barieră intracelulară. Nivelul activității antivirale, probabil, este dependent de concentrația extracelulară a IFN. Celulele învecinate celor producătoare de IFN devin cele mai rezistente la infecția cu virus, iar cele mai îndepărtate sunt mai puțin protejate.

Eficiența relativă a diferitelor mecanisme de apărare, inclusiv a celui mediat de IFN, depinde de calea de diseminare a virusului de la poarta de intrare: pe calea fluidelor organismului (sânge, limfă), prin leucocitele infectate sau pe cale axonală. Diseminarea pe cale sanguină şi limfatică este limitată de macrofagele asociate capilarelor sanguine şi limfatice. Viremia diminuează şi odată cu ea, severitatea infecției. Experiențele cu administrarea IFN evidențiază că IFN circulant reduce viremia şi protejează organele țintă. Interferonul este mai puțin eficient față de virusurile care se disemineză pe cale axonală.

La pacienții hipogamaglobulinemici, limitarea şi eliminarea infecției virale sunt rezultatul acțiunii IFN, a reacției febrile a organismului, a răspunsului inflamator şi a IMC.

Bazele moleculare ale activității interferonilor

Interferonii nu au activitate biologică în celulele care îi sintetizează. Principala lor activitate – cea antivirală- nu este directă, deoarece IFN nu sunt molecule efectoare, ci inductori ai stării antivirale (fig. 439). După secreția din celulele producătoare, IFN se leagă de receptorul membranar al altor celule, unde funcționează ca o citokină paracrină şi activează un set de gene specifice. Corespunzător celor două tipuri de IFN, se cunosc două tipuri de receptori*. Ambele sunt glicoproteine de membrană, alcătuite din două subunități diferite (heterodimer).

* Transmiterea semnalului în celulă şi activarea expresiei genelor este mai bine cunoscută în contextul proteinelor *JAK-STAT*. Proteinele familiei transductoare ale semnalului şi activatoare ale transcrierii (STAT) sunt *factori citoplasmatici latenți de transcriere* care sunt fosforilate la Tir, de către tirozin-kinazele familiei *Janus (JAK)*, ca răspuns la acțiunea stimulatoare a citokinelor. STAT-1 şi STAT-2 fosforilate recrutează un alt factor (IRF-9) şi formează un complex care este translocat în nucleu şi se leagă la regiunea promotor a genelor stimulate d IFN, rezultatul fiind starea antivirală şi apariția unor modificări ale metabolismului celular.

Sistemul IFNα/β, un component major al RI înnăscut față de infecția virală, este activat timpuriu, activează expresia câtorva sute de gene şi se sintetizează proteinele care mediază efectele lor multiple. Starea antivirală este produsă pe mai multe căi. Pot fi inhibate diferite etape ale ciclului de multiplicare virală: pătrunderea în celulă şi dezvelirea, transcrierea şi traducerea ARNm viral, replicarea genomului, asamblarea şi eliberarea virusului progen. Decisivă este natura virusului, dar tipul celular poate avea un rol important. Starea antivirală este, în esență, consecința acțiunii a două mecanisme.

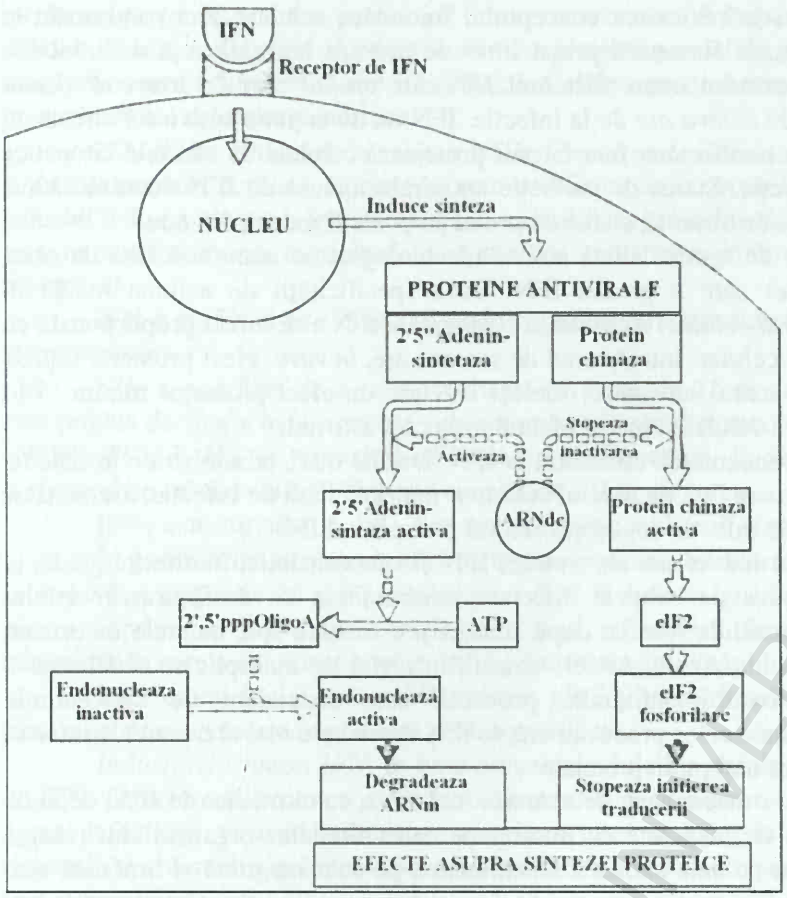


Fig. 439. Mecanismele acțiunii antivirale ale *interferonilor.* Interferonii se leagă specific de receptorii de IFN și produc numeroase efecte, două dintre ele fiind illustrate în schemă. IFN induc sinteza proteinelor antivirale – *2',5' adenozin-sintaza* și o *protein-kinază.* Ambele sunt activate de ARN dublu catenar, intermediarul replicării genomului viral ARN. Sintaza induce formarea 2',5' ppp-oligo A, care activează o endonuclează capabilă să producă degradarea ARNm. Protein-kinaza fosforilează factorul de inițiere al sintezei proteinelor, eIF_2, pe care îl inactivează (după Male, 1987).

a) În cele mai multe sisteme virus-celulă, inhibiția multiplicării virale este rezultatul *interferenței cu etapa traducerii* ARNm viral. Interferonul inhibă asocierea ribosomilor cu mesagerii virali. De exemplu, în celulele liniei L (originară din fibroblaste de embrion de șoarece), după infecția cu virus vaccinal, se produce dezagregarea polisomilor celulari. ARNm viral se asociază cu ribosomii eliberați și formează polisomi ce sintetizează proteine specific virale. In celulele tratate cu IFN, înainte de infecția virală, *ARNm viral nu se asociază cu ribosomii*, nu se sintetizează proteine și infecția este abortivă. Efectul este același după infecția cu reo-, picorna-, toga-, rhabdo-, paramixo-, herpes- sau cu papovavirusuri.

În celulele tratate cu actinomicina D (un inhibitor specific al sintezei proteice), efectul protector al IFN nu se realizează.

b) În celulele infectate, IFN induce sinteza unor proteine cu efecte antivirale:

- *protein-kinaza dependentă de ARN dublu catenar (PKR)*, denumită și kinaza factorului de inițiere a sintezei proteinelor la eucariote (eIF-2), inhibitoare a traducerii ARNm viral;
- sistemul *2',5'-oligoadenilat sintetaza/RN-aza L;*
- *adenozin-dezaminaza specifică pentru ARN (ADAR);*
- *produsul genei 56;*
- *proteinele Mx.*

PKR, ADAR, sistemul 2-5-OAS/RN-aza L sunt exprimate constitutiv în celulele normale, în formă latentă inactivă. Nivelul minimal al ARNm al acestor enzime este stimulat de IFNα/β. Enzimele sunt activate de ARNdc.

PKR (67 kDa) este o kinază serină/treonină celulară și în mod normal se sintetizează cu o rată foarte scăzută. Enzima, în proporție de 80% are sediul citoplasmatic (restul de 20% este nucleară, asociată în primul rând cu nucleolul), este asociată cu ribosomii și este mai fosforilată decât cea nucleară. PKR are rol esențial în răspunsul citoplasmatic la ARN dc.

PKR nefosforilată este inactivă, dar se activează prin *autofosforilare*[*], proces mediat de ARN dc.

[*] Celulele îşi reglează activitatea prin fosforilarea enzimelor şi a altor enzime. Fosforilarea are avantajul că este rapidă, nu necesită sinteza sau degradarea proteinelor pentru a schimba activitatea metabolică a celulei. Efectul este reversat sub acţiunea protein-fosfatazelor, care scot grupul fosfat. Multe enzime se activează prin fosforilare şi se inactivează prin defosforilare. Proteinele pot fi fosforilate la tirozină, serină, treonină sau la histidină. Fiecare dintre acestea necesită o clasă de kinaze. Pentru semnalizarea în SI sunt relevante fosforilările tirozinei şi serinei.

În celulele tratate cu IFN, nivelul PKR creşte de peste 20 de ori. Enzima este mediatoare a efectelor antiproliferative şi antivirale produse de IFN.

Activarea PKR influenţează transcrierea şi traducerea: în celula infectată cu un virus, PKR se asociază cu ARN dc şi se autofosforilează. PKR are două domenii de legare cu ARN şi un domeniu kinazic. Este activată de concentraţiile mici de ARN dc, dar este inhibată de concentraţiile mari. *In vitro*, ARN activator al PKR are o lungime de 33-80 pb.

PKR activată poate fosforila câteva substraturi celulare, fiind una dintre cele 4 kinaze mamaliene ce fosforilează *factorul 2α de iniţiere a sintezei proteinelor la eucariote* (eIF-2 α), ca răspuns la semnalele de stres, în special infecţia virală (Garcia, 2006). eIF-2 α fosforilat la resturile de serină şi treonină nu poate fi reciclat pentru iniţierea traducerii şi astfel sinteza proteinelor celulare este inhibată. PKR nu inhibă traducerea moleculelor de ARNm celulare şi virale care au particularităţi ale secvenţei 5' netraduse. La nivel celular, PKR are efect antiproliferativ, iar la nivelul organismului, PKR are efect antitumoral esenţial. Punctul de convergenţă al celor două efecte constă în efectul apoptotic al activării PKR.

O altă cale activată de ARN dublu catenar şi de IFN este cea mediată de acţiunea cooperantă a *2',5'-oligo-adenilat- sintetazei (OAS) şi a RN-azei L.* Interferonii induc sinteza unei familii de enzime denumite *2-5-adenilat-sintetaze*, care polimerizează ATP în oligo-adenilaţi de diferite lungimi, legaţi 2'–5'. Aceste enzime sunt inactive, dar se activează datorită unei schimbări conformaţionale care se produce consecutiv legării cu ARN dublu catenar. 2',5'-AS activată este capabilă să polimerizeze nucleotide rezultate din ATP şi alte nucleotide în legături 2'–5'. In molecula de 2',5'-oligoadenozină, resturile de riboză sunt legate prin punţi fosfo-diesterice 2'–5'. Acestea sunt legături unice, deoarece toate polinucleotidele naturale conţin legături 3'–5'.

Unica funcţie a *2',5'-oligoadenozinei* este activarea *RN-azei L.* RN-aza L este sintetizată constitutiv şi detectabilă în toate celulele animale. Majoritatea celulelor conţin o *fosfodiesterază* ce hidrolizează oligoadenilaţii 2',5' şi atenuează răspunsul 2-5A.

Oligomerul 2,5 A catalizează trecerea *RN-azei L* din forma monomerică, inactivă, în forma dimerică activă. *RN-aza L dimerică* dobândeşte activitate catalitică *endoribonucleazică.* Ea poate cliva ARN celular şi viral monocatenar, inclusiv ARNr 18S, 28S şi ARNm la secvenţe specifice, inhibând sinteza proteinelor. RN-aza L activată poate să inducă apoptoza.

Sinteza ADAR este indusă de IFN. ARN viral şi celular este modificat post-transcriere: *adenozin-dezaminaza specifică pentru ARN (ADAR)* îl modifică prin dezaminarea adenozinei. Este o enzimă importantă pentru *ARN-editing*[*].

[*]ARN-editing semnifică totalitatea modificărilor ARN rezultat prin transcrierea genelor continui şi care se fac prin adiţie de nucleotide fără matriţă, prin deleţie, substituţie sau conversie.

Dezaminarea *A* are importanţă biologică majoră. Conversia *A* la *I* (Inozină) modifică mesajul ARN[*], deoarece *I* este recunoscută ca *G* (nu ca A). Molecula de ARN astfel modificată este tradusă într-o proteină a cărei secvenţă de aminoacizi diferă faţă de a proteinei native.

[*] Modificarea extensivă s-a descris iniţial pentru ARNm al proteinei M (matrix) a virusului rujeolic de la pacienţii cu PESS. Pentru virusurile cu genom ARN de polaritate negativă, *hipermutaţia datorată dezaminării A* este asociată cu *persistenţa* infecţiei. Pentru virusurile cu genom ADN dc, modificarea reprezintă un mecanism prin care copiile de ARNm timpuriu sunt inactivate.

În contrast cu modificarea frecventă A – I la unele virusuri ARN, există câteva cazuri de ARN viral şi celular la care conversia A – I catalizată de ADAR are loc cu selectivitate înaltă, la poziţii specifice ale A. De exemplu, la HDV, ARN editing are rol esenţial pentru sinteza a 2 proteine cu funcţii diferite, de la un ORF: sinteza formei a a AgD se face după conversia selectivă a codonului terminal amber UAG, la codonul Trp UIG.

ADAR este o enzimă de 150 kDa, ce acționează asupra ARN, cu localizare în primul rând nucleară, dar şi în citoplasmă. Datorită localizării citoplasmatice şi capacității de a recunoaşte şi de a dezamina ARN dc, s-a sugerat că ADAR-L poate avea rol în apărarea față de virusurile care se multiplică în citoplasmă.

Proteina 56 (p56) se leagă de factorul de inițiere 3e al celulei eucariote (eIF3e), subunitate a eIF3 şi funcționează ca inhibitor al inițierii traducerii ARNm.

Proteinele Mx din familia GTP-azelor sunt mediatorii rezistenței genetice a şoarecelui la virusul gripal, acționează probabil prin înfăşurarea în jurul nucleocapsidei virale şi împiedică polimeraza virală să continue transcrierea catenei.

Strategii virale pentru contracararea mecanismelor de apărare ale gazdei. Pentru că strategia majoră de răspuns al celulei la infecția virală este creşterea concentrației de PKR, cele mai multe virusuri sintetizează proteine care degradează PKR, inhibă interacțiunea PKR cu ARN dc sau inhibă activitatea kinazei, prin interacțiune directă cu PKR blocând astfel autofosforilarea şi activarea ei.

La virusurile cu genom ARN mc, intermediarii de replicare sunt molecule de ARN dc, evidențiate în citoplasma celulelor infectate cu virusul rubeolei şi SFV. La virusurile cu genom ARN dc, chiar genomul este sursa ARN dc. Pentru cele mai multe virusuri, inductorul expresiei genelor pentru sinteza IFN α/β este ARN dc. Multe virusuri ARN dc au elaborat strategii care previn expunerea ARN dc în citoplasma celulei. La reovirusuri, genomul ARN dc rămâne în interiorul capsidei tot timpul ciclului viral. ARN mc de polaritate pozitivă este împachetat în particulele subvirale şi numai după aceea este sintetizată cea de a II-a catenă. Deoarece ARN dc are capacitatea potențială de a induce un răspuns antiviral, cei mai mulți intermediari ai replicării genomului ARN se găsesc *în asociație cu proteinele virale*, care maschează regiunile dublu catenare ale ARN viral. Pe de altă parte, ribonucleoproteinele virale sunt expuse catabolismului celular, care eliberează catenele ARN pozitive de cele negative. De aceea, în ciclul multiplicării virale, este expusă o cantitate foarte mică de ARN dc. ARN dc este, în esență, un produs minor al ciclului de multiplicare virală.

Alte activități biologice. IFN α/β stimulează expresia moleculelor CMH I, dar numai IFN γ stimulează expresia moleculelor CMH II (fig. 440). Creşterea nivelului lor se crede că măreşte eficiența RIMC.

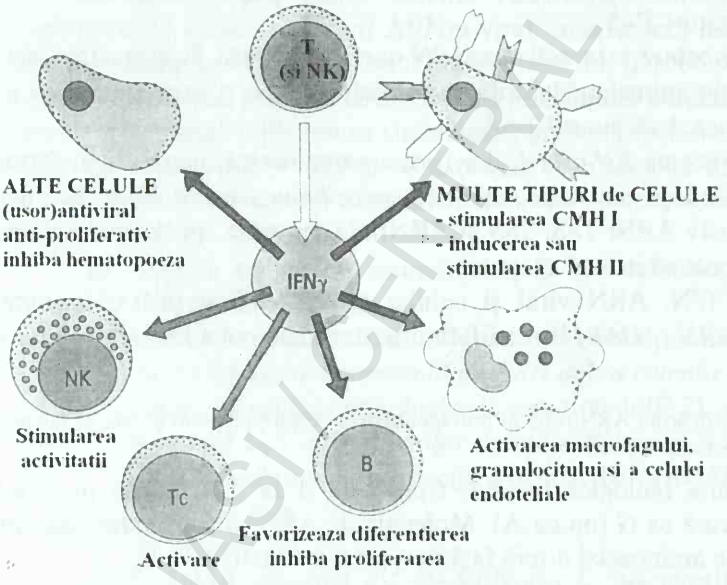


Fig. 440. Funcțiile IFNγ sunt multiple: activitățile antivirală şi antiproliferativă sunt mai puțin intense decât ale IFNα şi IFNβ, dar este inductor mai puternic al activării moleculelor CMH clasa II pe celulele tisulare, fiind sinergic cu TNFα şi TNFβ (după Roitt, 1998).

IFN influențează prelucrarea şi prezentarea peptidelor antigenice, modulând expresia componentelor celulare ale proteasomilor ce generează peptide şi a componentelor celulare care orientează peptidele pentru interacția cu moleculele CMH I.

Interferonii au acțiune directă, prin inducerea modificărilor în membrana plasmatică a celulei, mărind rigiditatea stratului lipidic. Acesta poate fi mecanismul efectului inhibitor al IFN asupra transformării maligne a celulelor, sub acțiunea virusurilor oncogene.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Interferonii sunt inductori ai enzimei nitric-oxid-sintetază (NOSi), care prin oxidul nitric (NO) inhibă multiplicarea virusurilor în anumite celule. NOSi este implicată în funcţia macrofagelor activate şi în patogeneza maladiilor inflamatorii şi autoimune. IFN γ este activator al macrofagului, iar NO este un efector important al mecanismelor sale antimicrobiene. Unele efecte citotoxice ale NO se datorează reactivităţii cu Fe din enzimele mitocondriale şi inhibă transportul electronilor pe catena de respiraţie.

IFN inhibă nu numai multiplicarea virusurilor, ci şi creşterea şi multiplicarea microorganismelor parazite intracelulare, unele activităţi metabolice tisulare (de exemplu, pentru că inhibă sinteza proteică, IFN poate să inducă procese de necroză celulară). IFN inhibă multiplicarea celulelor tumorale, creşterea şi diviziunea celulelor normale, reacţiile de hipersensibilitate întârziată. IFNα are proprietăţi antiproliferative şi se foloseşte în tratamentul unor neoplazii (sarcomul Kaposi, leucemia păroasă, melanom, negi genitali). Tumorile originare în limfocitele B sau în celulele plasmocitare sunt cele mai sensibile. IFNγ este activ în maladia Hodgkin (proliferarea malignă a limfocitelor B ganglionare) şi în CGD (boala cronică granulomatoasă). Cel mai mare succes terapeutic al IFN a fost în tratamentul leucemiei 'păroase' (*hairy cell*), denumită astfel după aspectul spinos al suprafeţei celulei.

IFNα, uman recombinant, singurul disponibil comercial, se utilizează pe scară largă în *tratamentul infecţiilor virale*: cu virus rabic, virusuri encefalitogene, CMV, VHB, VHC. Nu se absorb din tractul gastro-intestinal şi de aceea se administrează prin injectare im sau sc. In sânge, timpul de înjumătăţire este scurt, dar starea antivirală poate dura câteva zile. Efectul lor este ameliorarea sau chiar eliminarea infecţiilor persistente. 50% dintre pacienţii cu VHC răspund prin ameliorarea funcţiilor hepatice, a inflamaţiei hepatice şi a nivelului ARN viral în ser, iar la 20% dintre ei, infecţia este eliminată.

IFN sunt activi numai dacă se administrează timpuriu în evoluţia infecţiei, când sistemul imunitar este intact funcţional. IFN nu traversează bariera placentară.

Administrarea IFN produce efecte benefice sau poate să se transforme într-o furtună a citokinelor cu efecte sistemice: inflamaţie, febră, dureri de cap, mialgie, artralgie, anemie, senzaţie de oboseală sau de rău general (o stare 'influenza-like'). Toleranţa se instalează curând şi terapia poate continua. La 2–3% dintre cei trataţi, se sintetizează anticorpi specifici.

Pacienţii cu maladii autoimune au nivele crescute de IFN produs de celulele dendritice plasmocitoide (CDp) stimulate de ADN şi de snRNA (small nuclear). Administrarea IFN în scop terapeutic poate agrava maladia autoimună.

Efectele *stimulatoare* ale IFN se exercită asupra nivelului de exprimare a unor molecule de suprafaţă a celulelor (de exemplu, moleculele CMH, receptorii de mare afinitate pentru regiunea Fcγ ai macrofagului, cu consecinţe importante pentru rata eliminării complexelor imune prin fagocitoză şi asupra fenomenului ADCC).

Interferonii au proprietăţi imunomodulatoare: stimulează activitatea citotoxică a *limfocitelor NK* şi activează metabolismul oxidativ al macrofagelor, precum şi activitatea lor antitumorală. Pe suprafaţa limfocitelor T, IFN stimulează expresia receptorilor pentru IL-2 şi implicit răspunsul imun, dacă este administrat concomitent cu antigenul. Efectul imunostimulator al IFNα se poate atribui unei mai bune exprimări a moleculelor CMH pe celulele accesorii ale RI, ceea ce condiţionează o prezentare mai eficientă a antigenului.

Semnificaţia biologică. IFN sunt componente ale reţelei citokinelor. Citokinele sunt molecule active, produse de diferite categorii de celule, sub acţiunea unor stimuli, inclusiv sub acţiunea IFN.

Citokinele interacţionează cu receptorii altor celule şi reglează procesele lor de proliferare şi diferenţiere. Deoarece limfocitele stimulate produc IFNγ, interferonii fac parte din categoria limfokinelor.

Producerea IFN. In unele celule, sinteza IFN este indusă spontan, în absenţa unui inductor detectabil. IFN α şi γ sunt produşi de liniile celulare limfoblastice originare în celulele T, în concentraţii variabile, de la 1 la 1000 U/ml.

Interferonii sunt produşi prin tehnologia *ADN recombinant*, în celule manipulate genetic. Genele codificatoare ale sintezei IFN au fost izolate, secvenţiate şi inserate în vectori de clonare. Aceştia au fost transferaţi în celula procariotă (*E. coli*) sau eucariotă. Genele codificatoare ale IFN sunt funcţionale atât în celule bacteriene, cât şi în celule de levuri şi de mamifere. Pe această cale, *in vitro,* sau obţinut cantităţi mari de IFN (utilizabili în clinică).

Bibliografie

Samuel C. E. 2001. *Antiviral Actions of Interferons*. Clin. Micr. Rev vol. 14, no. 4, pp. 778–809.

Kumar M., Carmichel G. G. 1998. Antisense RNA : Function and Fate of Duplex RNA in Cells of Higher Eukaryotes – Micr. and Mol. Biol. Rev. vol. 62, no. 4, p. 1415 – 1434.

Farrar M. A., Schereiber R. D. 1994. The Molecular Cell Biology of Interferon-gama and its Receptor. Annu. Rev. Immunol., 12: 517–611.

Vilcek J., Sen G. C. 1996. Interferons and other Cytokines, în vol. Fields Virology, Third Edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincot – Raven Publishers, Philadelphia.

Joklik W. K. 1985. Interferons, în vol. Virology, ed. by B. N. Fields et al., Raven Press, New York.

Joklik W. K. 1991. Interferons, în vol. Fundamental Virology, second Edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press Ltd. New York, 1991.

Whitton L. J., Oldstone M.B.A. 1996. Interferons, în vol. Fields Virology, Third Ed., ed. by B. N Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincot- Raven Publishers, Philadelphia.

Bluyssen H. A. R. 1998. Interferon alpha, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed., ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.

Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J. C. 1997. Cellular Responses to Interferon gama – Annu. Rev. Immunol. 15: 749–795.

Vilcek J. 1998. Interferon gama, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed., ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.

Garcia M. A., Gil J., Ventoso I., Guerra S., Domingo E., Rivas C., Esteban M. Impact of Protein kinase PKR in Cell Biology: from Antiviral to Antiproliferative Action – MMBR, 70(4): 1032–1060.

22.2. Răspunsul imun antiviral specific (adaptativ)

Mecanismele de apărare nespecifică (IFN, acțiunea celulelor NK, răspunsul mucociliar) influențează evoluția infecției. Majoritatea infecțiilor respiratorii şi enterice sunt inaparente (subclinice) şi această modalitate de evoluție se datorează eficienței mecanismelor de apărare nespecifică. Dacă barierele imunității nespecifice sunt depăşite, infecția evoluează în forma clinică şi activează răspunsul imun specific.

Proteinele virale, componente ale capsidei şi peplosului, sunt imunogene şi induc un răspuns imun intens în organismul gazdă. Răspunsul imun antiviral este orientat atât față de antigenele exprimate pe suprafața virionilor, cât şi față de antigenele prezentate pe suprafața celulei infectate.

Antigenele expuse pe suprafața celulei infectate, diferă în funcție de natura virusului (nud sau învelit) şi de mecanismul maturării virionilor. Celulele infectate cu virusuri nude (adeno-, reo-, entero-) expun pe suprafața lor proteine virale asociate cu moleculele CMH I, iar cele infectate cu virusuri învelite, în special cu virusuri care se maturează prin înmugurire la nivelul membranei, expun glicoproteinele peplosului, inserate în arii limitate ale membranei. În ambele cazuri, celula infectată devine ținta mecanismelor de recunoaştere imunitară.

Antigenele expuse pe suprafața virionului sau a celulei infectate, stimulatoare ale răspunsului imun, se numesc *antigene protectoare*. Antigenele intrinseci ale virionului au rol protector nesemnificativ, deoarece nu vin în contact cu sistemul imunitar, decât în cazul în care se sintetizează în exces şi se elimină din celula infectată.

Activarea coordonată a celor două compartimente ale RI este esențială pentru controlul şi eradicarea infecției virale, care necesită eliminarea eficientă atât a virusului din spațiul extracelular, cât şi a celulelor infectate.

În unele infecții, în faza intracelulară a multiplicării virale, RI este dominat de setul de limfocite Th_1 (activatoare ale IMC), iar ulterior, după eliberarea virionilor progeni, RI dominat de setul Th_2 (activatoare ale IMH), este mai adecvat pentru apărarea gazdei. Antigenele virale libere sau asociate virionului, stimulează *răspunsul imun humoral*, iar cele prezentate pe suprafața celulelor infectate, stimulează IMC.

Activarea unuia sau altuia dintre compartimentele imunității, depinde de mai mulți factori: de tipul infecției (primară sau secundară), de rezultatul interacțiunii virus-celulă (liză sau infecție persistentă) etc.

Virusurile care produc *infecții acute*, induc o competiție între multiplicarea virală şi efectorii răspunsului imun. Rezultatul este însănătoşirea sau moartea gazdei.

Pentru virusurile care produc *infecții cronice*, scara de timp a interacțiunii este mai lungă. Majoritatea manifestărilor clinice care însoțesc infecțiile virale cronice, sunt consecința răspunsului

imun al gazdei, stimulat de antigenele virale. Virionii sau antigenele virale din sânge sau din alte fluide formează cu anticorpii, complexe Ag-Ac, cu manifestări patologice secundare. Alteori, anticorpii antivirali şi celulele T activate, pot produce leziuni ale celulelor infectate.

22.2.1. Imunitatea mediată humoral

După infecţia *virală primară* sau după administrarea *vaccinului inactivat*, se stimulează răspunsul humoral (fig. 441) şi IMC citotoxic.

Răspunsul imun humoral faţă de antigenele virale parcurge etapele descrise anterior, dar prezintă anumite particularităţi, ca o consecinţă a naturii acestor entităţi infecţioase. Virusurile pătrund în organism, la nivelul mucoaselor şi prin leziunile tegumentare.

Receptorii imunoglobulinici ai limfocitelor B recunosc Ag virale în formă nativă sau sub forma proteinelor solubile secretate de celulele infectate.

Virusul infectant înglobat de limfocitul B şi de CD, este prelucrat proteolitic în compartimentul endocitar acid, iar peptidele antigenice sunt prezentate în asociaţie cu moleculele CMH II. Pe suprafaţa CPA, epitopii virali sunt recunoscuţi de limfocitele TCD_4. Acestea au, în esenţă, funcţie reglatoare prin setul de limfokine pe care le secretă şi modulează în special, răspunsul specfic al limfocitelor B faţă de Ag viral şi în măsură mai mică, răspunsul limfocitelor T.

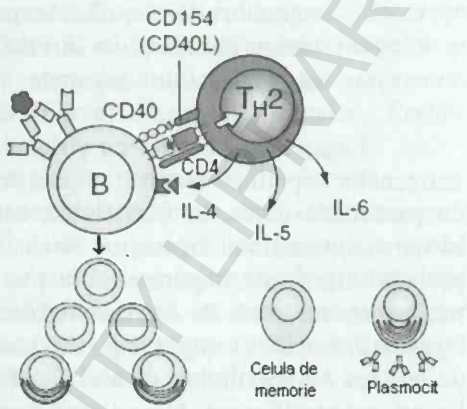


Fig. 441. Răspunsul imun antiviral mediat humoral. Virusul este recunoscut de Ig de suprafaţă a limfocitelor B, internalizat şi prelucrat. Peptidele virale se asociază cu moleculele CMH II şi sunt expuse pe suprafaţa limfocitului B. Complexul peptid-CMH II este recunoscut de celula TCD_4. Pentru eliberarea semnalului activator este necesară interacţia ligandului CD_{40} al celulei CD_4, cu receptorul pentru ligandul CD_{40} al limfocitului B. Limfocitul T eliberează citokine (IL-4, 5, 6), activatoare ale celulei B. Celula B răspunde prin proliferare şi generează două categorii de celule: de memorie şi plasmocite (după Neurath, 2009).

Celulele dendritice (derivate din celule precursoare din măduva osoasă) sunt foarte numeroase la porţile de intrare a virusurilor, dar sunt imature: preiau antigenul viral, dar nu pot să-l prezinte celulelor T neinformate, pentru că moleculele CMH II membranare au o densitate mică şi lipsesc moleculele co-stimulatoare. CD au însă receptori pentru chemokine (mediatori ai deplasării orientate), ceea ce duce la recrutarea lor în situsurile inflamatorii.

Sub acţiunea stimulatoare a antigenelor invadante, CD se maturează. Capacitatea lor de a endocita antigenele creşte în perioada de maturare, apoi scade treptat. CD internalizează antigenele prin fagocitoză, EMR sau prin pinocitoză. Unele virusuri infectează CD, iar paramixovirusurile pătrund în CD prin fuziunea peplosului cu membrana citoplasmatică. Cele mai multe virusuri nu infectează direct CD, dar virionii eliberaţi în ciclul de multiplicare şi antigenele moleculare sunt preluate, prelucrate şi prezentate de CD activate.

CD expun Ag virale solubile în asociaţie cu moleculele CMH I şi II. Pe această cale, virusurile care nu pot infecta CD stimulează un RI eficient, prin activarea celulelor TCD_8 specifice neinformate.

Celulele dendritice de tip 1 (mieloid) secretă IL-12 şi stimulează răspunsul Th1 (IMC), iar CD de tip 2 (plasmocitoid) secretă cantităţi mici de IL-12 şi stimulează răspunsul imun de tip Th2 (IMH), cu activarea celulelor B şi a macrofagelor.

Cea mai mare parte a Ig se sintetizează în MALT, predominant la nivelul intestinului, mai mult decât în măduva osoasă, sub forma IgA, deoarece suprafaţa mucoasei este poarta de intrare a multor agenţi infecţioşi.

Răspunsul *humoral* are o dinamică lentă şi constă în sinteza IgM, IgA şi IgG. În stadiul acut al infecţiei, titrul Ac specifici este abia detectabil, dar atinge valoarea maximă la 2–4 săptămâni şi persistă săptămâni sau luni, în funcţie de gazdă, virus etc. Pentru virusul febrei galbene şi cel rujeolic, nivelul detectabil al Ac persistă tot restul vieţii.

Rolul protector al Ig este variabil de la un virus la altul, în funcţie de sediul multiplicării, care la rândul său condiţionează manifestările patologice ale infecţiei.

BUASVM TIMIŞOARA UNIVERSITY LIBRARY

În funcție de mecanismul patogenezei, se disting trei tipuri de virusuri:

- virusurile care infectează *mucoasele tractului respirator și digestiv* și rămân la poarta de intrare: rhinovirusuri, influenza, parainfluenza, virusul respirator sincițial, enterovirusuri;
- virusuri care infectează și se multiplică în celulele *mucoaselor*, iar ulterior se *disemineză* pe cale sanguină, limfatică sau axonală, pentru a infecta viscerele sau SNC: virusul polio, rujeolic, al oreionului, herpes simplex, pox, virusul hepatitei A;
- virusurile *inoculate direct în sânge*, prin mușcătură, înțepătură, prin traume, iar de aici se răspândesc la organele țintă: HIV, virusul hepatitei B, virusul rabic, virusurile encefalitogene (alfa- și flavivirusuri).

Legarea anticorpilor cu virionul se face după modelul complementarității spațiale între epitopii antigenelor suprafeței virale și situsul de combinare al anticorpilor. Efectul principal al interacțiunii Ac cu particulele virale, în faza fluidă, este *neutralizarea*, adică pierderea infecțiozității virionilor, prin blocarea interacțiunii liganzilor virali cu receptorii celulari. Fenomenul s-a demonstrat *in vitro*, dar probabil este foarte important și *in vivo*. Pentru producerea efectului neutralizant este necesară legarea mai multor molecule de Ac, care trebuie să recunoască o structură esențială a virionului, denumită *situs (epitop) critic*. De exemplu, fagii din seria T-par au un singur situs critic și infecțiozitatea lor este anulată de legarea Ac specifici la nivelul fibrelor cozii. Pentru virionul gripal, anticorpii anti-HA sunt neutralizanți, cei specifici anti-NA au efect neutralizant minim, iar Ac anti-proteină M sunt total ineficienți.

La adenovirusuri, situsurile critice sunt *capsomerele hexonice și fibra pentonică*. Anticorpii specifici față de aceste structuri sunt neutralizanți, iar Ac anti-penton nu diminuează infecțiozitatea. Pentru HIV, situsul critic este *glicoproteina 120*, prin care virionul se atașează de moleculele CD_4 ale limfocitului Th. Anticorpii specifici față de liganzii peplosului virionilor herpetici au efect neutralizant.

Anticorpii specifici interacționează cu Ag virale extracelulare, dar nu implică virusul intracelular. Fixarea Ac pe antigenele virale expuse pe suprafața celulei infectate poate preveni eliberarea virionilor. Activarea cascadei C produce liza celulei infectate (*citoliza*).

Anticorpii necitolitici pot masca antigenele virale expuse la suprafața celulei, devenind astfel inaccesibile celulelor efectoare litice (limfocite Tc, NK).

Proteinele complementului pot acoperi virionii înveliți, tapetați cu Ac și se produce liza. Retravirusurile sunt lizate de C, chiar în absența anticorpilor. Complementul pare să aibă rol în faza timpurie a infecției, când Ac au afinitate mică și titrul scăzut. Proteinele C sunt importante ca mecanism efector humoral față de infecțiile bacteriene, dar rezistența celor cu deficit al C, față de infecțiile virale este normală.

Anticorpii antivirali sintetizați în cursul RIP au specificități multiple, au energie mică (afinitate) de legare cu situsurile antigenice ale virionilor și se disociază ușor, lăsând o infecțiozitate reziduală. Alteori, moleculele de anticorpi nu acoperă situsurile critice ale virionilor și nu sunt neutralizanți. Ac neutralizanți se sintetizează mai târziu și sunt esențiali pentru protecția față de reinfecția cu virusul omolog.

Anticorpii antivirali contribuie la eliminarea virusului (clearance) prin blocarea interacțiunii cu celulele sensibile, iar complexele Ag-Ac-C sunt epurate de celulele fagocitare. Regiunea Fc a Ac este recunoscută de fagocite și astfel este accelerată eliminarea Ag virale din mediul intern. Nu numai proteinele structurale ale virusului induc un RI protector: proteinele NS ale flavivirusurilor stimulează RI protector față de virusul febrei galbene, denga, virusul encefalitei transmisă de căpușe.

Anticorpii au o contribuție esențială la încheierea proceselor infecțioase cu *fază viremică* deoarece *reduc încărcătura de virus în sânge* și diminuează infecțiozitatea. Consecința este scăderea numărului de celule infectate și ușurarea sarcinii celulelor T citotoxice. La om, IMH față de infecțiile virale sistemice poate dura câteva decade, având rol important în prevenirea reinfecției și în protecția nou-născutului. Menținerea nivelului seric înalt de Ac se numește *memorie serologică*. Timpul de înjumătățire al Ig serice este de 7–21 zile. Menținerea pe termen lung a titrului crescut al Ac serici necesită sinteza continuă a acestor molecule, chiar în absența Ag. Celulele B de memorie se activează și se diferențiază în celule plasmatice. Dacă infecția este persistentă, Ag virale recrutează noi celule B.

Celulele infectate cu virusuri pot fi lizate prin *fenomenul ADCC* (*a*ntibody *d*ependent *c*ell *c*itoxicity), prin acțiunea limfocitelor Tc sau NK. Celulele NK și macrofagele ce poartă receptori pentru regiunea Fc, se leagă cu Ac fixați pe suprafața celulei infectate și eliberează enzimele citolitice.

Tapetarea virionului cu Ac nu este totdeauna suficientă pentru efectul neutralizant. Eficiența protectoare a Ac creşte odată cu disocierea complexului Ag-Ac de pe suprafața virionului.

Răspunsul imun este considerat ca un factor de selecție negativă a agenților patogeni, deoarece teoretic, duce la eliminarea acestora. Dar, uneori, reactivitatea imunitară influențează favorabil multiplicarea patogenului: unele virusuri induc sinteza Ac specifici pentru a dobândi intrarea în celula țintă, lărgind spectrul receptorilor celulari. Complexele virus-Ac-C pot fi infecțioase, deoarece regiunea Fc a Ig se fixează pe receptorul pentru Fc sau pentru C al monocitelor/macrofagelor şi granulocitelor. Anticorpii stimulatori ai procesului infecțios sunt denumiți Ac de *enhancement*. Fenomenul s-a demonstrat *in vitro* pentru *Bunya-, Corona-, Flavi-, Ortho-, Paramyxo-, Retra-, Rhabdo- şi Togavirusuri*.

În cursul *infecției secundare*, anticorpii se sintetizează rapid, la titru înalt.

Imunopatologie. La pacienții cu infecții persistente asociate cu viremie, anticorpii antivirali pot să producă efecte *patologice* indirecte. Anticorpii se fixează pe virioni, pe proteinele virale solubile din sânge şi formează complexe Ag-Ac în exces, care se pot depune în capilarele glomerulilor renali datorită presiunii sanguine de 4 ori mai mare. Este inițiată activarea C, cu eliberarea peptidelor chimiotactic pozitive pentru PMN şi monocite. Leucocitele activate eliberează citokine inflamatorii (TNF, IL-1, ROI, enzime lizosomale) ce induc inflamația, rezultatul fiind glomerulonefrita.

22.2.2. Protecţia antivirală a mucoaselor

Protecția antivirală a mucoaselor (fig. 442) este dependentă, în primul rând de IgA. Sinteza locală a Ac (în special IgA) după stimularea virală, este relativ independentă de răspunsul imun sistemic şi are efect protector, în absența anticorpilor sistemici.

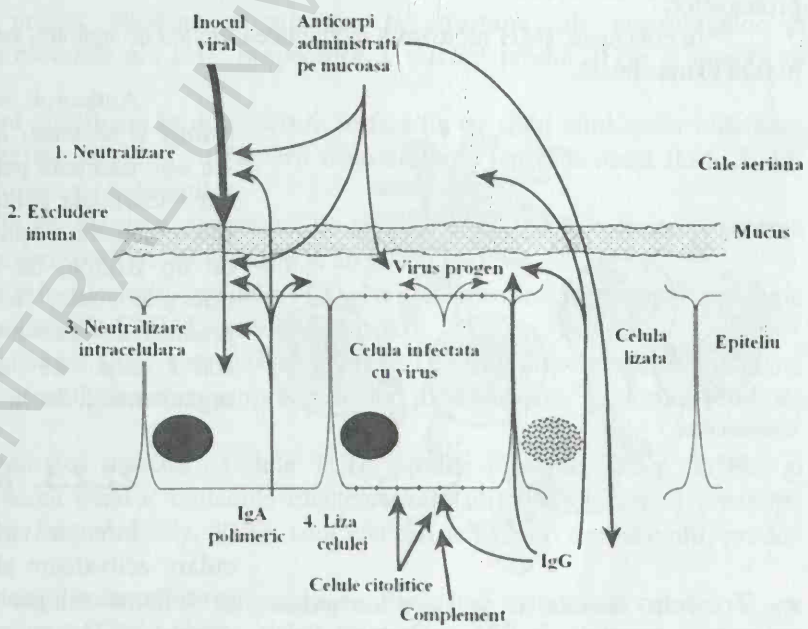


Fig. 442. Mecanismele protectoare ale mucoasei tractului respirator față de infecția virală. După inoculare, particulele virale sunt *neutralizate* (1) de anticorpi, care ajung la suprafața mucoasei prin transport transepitelial (IgA polimeric), prin difuzie (IgG) sau prin administrare artificială (picătură, spray, aerosoli). Alt mecanism este '*excluderea imună*'(2), proces al cărui mecanism constă în legarea virionilor în complexe Ag-Ac şi îndepărtarea lor prin activitate mucocilară. Anticorpii pot difuza prin mucus pentru a neutraliza virusul patogen şi particulele care trec prin stratul de mucus. Neutralizarea virală poate să se producă *intracelular* (3), în timpul transportului IgA polimeric, aşa cum s-a demonstrat experimental pentru virusurile Sendai şi influenza *in vitro* cu monostrat de celule epiteliale polarizate. La suprafața bazolaterală a celulelor epiteliale infectate, IgG se poate fixa specific de proteinele membranare codificate de virus şi mediază *liza celulei* (4) după fixarea complementului sau prin fenomenul ADCC. Celulele infectate de virus pot fi lizate sub acțiunea limfocitelor Tc specifice. Liza celulelor epiteliale uşurează trecerea efectorilor imunitari în ambele direcții (dupăWeltzin, 1999).

Anticorpii din secrețiile mucoaselor îndeplinesc două funcții majore față de agenții patogeni virali: *excluderea imună şi neutralizarea infecțiozității virale*.

Excluderea imună este un mecanism protector foarte important la nivelul mucoasei respiratorii şi pare a fi dependent nu numai de imunoglobuline, ci şi de stratul de mucus care acoperă epiteliul. sIgA neutralizează infecțiozitatea virionilor prin legarea încrucişată a epitopilor virali, iar *secreția mucoasă* este în primul rând, *o barieră mecanică* ce blochează adsorbția virionilor pe membrana

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

celulelor epiteliale. După ce sunt sechestrați în stratul de mucus, virionii sunt eliminați spre nazofaringe prin acțiunea mecanică a cililor. Absența activității ciliare este asociată cu infecții severe ale tractului superior, sugerând importanța barierei mucoase.

sIgA are rol esențial în rezistența la reinfecția cu virusurile care se multiplică exclusiv în celulele epiteliale ale mucoaselor digestive și respiratorii. De exemplu, vaccinarea orală cu virus polio inactivat are ca scop stimularea imunității mucoasei. La titru crescut, anticorpii serici (IgM) difuzează în mucoase. Nu se știe în ce măsură anticorpii din secreții sau din sânge protejează epiteliul tractului respirator inferior. În tractul respirator inferior, în secreția mucoasă, se găsesc concentrații mari de IgA și IgG. Anticorpii serici trec în secreții, în mare parte, prin difuzie printre celulele epiteliale.

Deși vaccinurile gripale se administrează parenteral, protecția antiinfecțioasă este conferită de Ac din secreții (sIgA). sIgA conferă o mai bună protecție încrucișată față de variante antigenice rezultate prin drift antigenic, comparativ cu IgG circulant.

Imunizarea pasivă este utilizată în scop profilactic (diminuează riscul infecției virale) și pentru terapia infecțiilor virale stabilizate. Are avantajul că efectul protector este imediat, iar efectele colaterale sunt rare. Administrarea profilactică a Ac este mai eficientă.

Ig folosite pentru imunizare pasivă pot fi *policlonale* sau *monoclonale*, prin administrare im sau iv. Se folosesc Ig anti-VHA, VHB, CMV, rabic, VSR, virusul variolei, rujeolei, rubeolei, parvovirus B_{19}, EBV, HSV, poliovirus, Hantavirus, West Nile, rotavirus, HIV-1, Ebola, SARS-CoV.

Anticorpii administrați prin *imunizare pasivă* ajung în secrețiile tractului respirator și pot să prevină, să diminueze sau să vindece infecțiile virale. Imunizările s-au făcut în special cu IgG pentru că este mai ușor de obținut. IgA are avantajul de a fi polimeric și teoretic, are activitate aglutinantă superioară față de IgG și pentru că nu fixează C, probabil nu stimulează reacțiile inflamatorii. Are o perioadă de activitate mai lungă, deoarece componenta secretoare (CS) îl protejează de acțiunea proteazelor.

În concluzie, IMH reprezintă modalitatea *tactică* de apărare, ce constă în neutralizarea virusurilor în faza extracelulară.

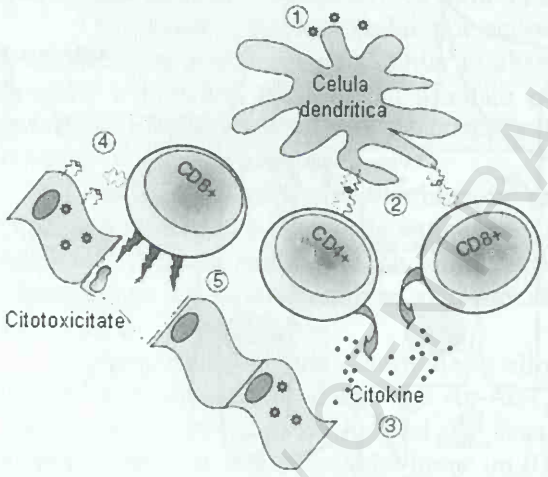


Fig. 443. RIMC antiviral. 1. Ag virale sunt preluate, prelucrate și prezentate de CPA profesioniste (celula dendritică). 2. Complexele CMH-peptid sunt recunoscute de limfocitele TCD_4 și TCD_8. Limfocitele activate secretă citokine stimulatoare ale proliferării și diferențierii în celule efectoare. 3. Celulele TCD_4 eliberează citokine IL-2, IFNγ, TNFα, activatoare ale celulelor TCD_8, dar pot avea și efecte antivirale directe. 4. Celulele TCD_8 activate se dispersează în țesuturi, unde răspund local la situsul infecției virale și (5) exercită efecte citotoxice asupra celulelor infectate. Celulele TCD_4 pot să devină citotoxice, dar impactul lor este mult mai limitat, deoarece recunosc complexele peptid-CMH II, exprimate numai pe CPA profesioniste (după Zajac, 2008).

Anticorpii se sintetizează în răspunsul imun primar și secundar antiviral. Activitatea protectoare a Ac este esențială pentru controlul unor infecții virale, dar neesențială pentru controlul altor infecții primare sau secundare. Copiii cu agamaglobulinemie înnăscută de tip Bruton, nu au sensibilitate crescută față de infecțiile virale, cu excepția meningitei enterovirale, produsă de echovirusurile 9 sau 11. Anticorpii sunt activi față de antigenele virale din umorile organismului, dar nu pătrund în celulele infectate.

22.2.3. Imunitatea mediată celular

Infecția virală declanșează semnale moleculare activatoare ale IMC: sinteza IFN, citokinelor proinflamatorii, mobilizarea CD locale (fig. 443). Se crede că CD sunt predispuse la infecția cu virusuri, ceea ce ușurează funcția lor de senzori ai infecției virale. Chiar dacă nu sunt sensibile la infecție, CD funcționează ca o punte comună, stimulatoare a celulelor CD_8 și CD_4, pe calea clasică a prelucrării Ag exogene.

Imunitatea mediată celular (IMC) constituie mecanismul major al apărării specifice antivirale. Efectorii IMC sunt celulele TCD_8 (citotoxice). Limfocitele T nu recunosc proteinele virale intacte și nu neutralizează virionii.

IMC se activează după mecanismul clasic: Ag virale prelucrate sub forma peptidelor scurte (8–10 aminoacizi) şi prezentate în asociaţie cu moleculele CMH sunt recunoscute specific prin intermediul receptorului de antigen al limfocitelor T.

Orice proteină codificată de virus, structurală sau nestructurală, poate fi prelucrată de *celulele infectate sau de celulele accesorii ale răspunsului imun.*

Fragmentele peptidice derivate după prelucrarea Ag virale sintetizate în interiorul celulei infectate (antigene endogene), sunt prezentate în asociaţie cu *moleculele CMH I.* Aceste molecule furnizează informaţii timpurii despre invazia virală pentru activarea limfocitelor TCD_8, a căror funcţie esenţială este liza timpurie a celulelor infectate. Celulele CD_8 recunosc orice proteină virală, structurală sau nestructurală, asociată cu moleculele CMH şi lizează celulele infectate prin contact direct sub acţiunea factorilor litici sau eliberează citokine ce interferă cu multiplicarea virală.

Recunoaşterea Ag de către celulele T este supusă fenomenului restricţiei CMH*, adică celula T efectoare şi CPA trebuie să aibă molecule CMH identice.

* Numărul lor creşte după infecţia cu influenza, cu virus vaccinal, cu EBV, cu HIV-1. După infecţia cu LCMV, care produce ECP minim, dar stimulează intens IMC, numărul lor creşte de circa 10.000 de ori.

În stadiul timpuriu al infecţiei virale, CD interstiţiale (CDI) de la poarta de intrare a virusului, preiau Ag virale, se activează şi migrează în organele limfoide secundare (OLS): ganglionii limfatici regionali şi splină, unde Ag este prezentat celulelor T neinformate, care circulă în fenomenul normal al imunosupravegherii. Celulele T care recunosc Ag, exprimă molecule de aderenţă, proliferează şi se diferenţiază în celule T efectoare specific-virale.

CD au calitatea dublă, de a prezenta Ag înglobate în asociaţie cu moleculele CMH I şi CMH II.

În OLS, Ag prezentate în asociaţie cu moleculele CMH II sunt recunoscute de *celulele* TCD_4. După activare, *celulele* TCD_4 produc citokine stimulatoare şi atractante ale macrofagelor şi neutrofilelor, efectoare antivirale esenţiale ale IMC nespecifice, deoarece produc IFNγ şi uneori au efect litic asupra celulelor ţintă.

Clasic, celulele TCD_4 sunt clasificate în două seturi, în funcţie de setul citokinelor eliberate: Th_1 stimulatoare ale IMC în infecţiile virale şi cu bacterii intracelulare; Th_2 eliberează IL-4, 5, 13, stimulatoare ale IMH, cu rol în eliminarea helminţilor.

Al III-lea set de celule TCD_4 exprimă o proteină de suprafaţă (CD_{25}) şi o proteină internă ($FoxP_3$), produc citokinele imunosupresoare IL-10 şi TGFβ şi au rol reglator.

În faza iniţială a multor infecţii virale, celulele TCD_8 care au recunoscut epitopul antigenic prezentat de CD în asociaţie cu moleculele CMH I, proliferează masiv.

Din organele limfoide secundare, unde s-au activat, celulele TCD_8 se dispersează în organism, iar la locul infecţiei îşi exercită efectul citotoxic asupra celulelor ţintă, mediat, în primul rând, de *granzime* şi *perforină.*

În afară de acţiunea citotoxică directă, celulele TCD_8 produc citokine (IFNγ, TNFα) şi chemokine. În laborator, evidenţierea acestor molecule efectoare este utilizată ca test al prezenţei celulelor T cu activitate antivirală. *In vivo*, IFNγ, TNFα sunt efectori antivirali: de exemplu, produc moartea hepatocitelor infectate.

Al II-lea mecanism de acţiune implică interacţiunea FasL pe membrana celulei T, cu receptorul pentru Fas pe suprafaţa celulei infectate.

După infecţia primară sau după administrarea vaccinului viral atenuat, răspunsul celulelor Tc are activitate maximă la 7–10 zile şi scade la 2–3 săptămâni după infecţie.

Pentru controlul infecţiei virale, IMC este, uneori, esenţială*.

* In infecţia cu virusul rujeolic, la copiii normali, infecţia produce erupţia tegumentară caracteristică şi ulterior virusul este eliminat. La copiii cu deficienţă a celulelor T, infecţia este adeseori fatală. Manifestările eruptive sunt mediate de celulele T şi la copiii imunosupresaţi nu se produc. Apariţia erupţiei este indicatorul evoluţiei favorabile. La copiii agamaglobulinemici, erupţia se produce şi evoluţia infecţiei este nealterată de absenţa anticorpilor. Se instalează imunitatea de memorie.

La pacienţii cu sindrom Di George (cu aplazie timică congenitală), la pacienţii SIDA, la cei leucemici sau la cei supuşi terapiei imunosupresoare prelungite, frecvenţa şi severitatea infecţiilor virale cresc semnificativ.

IMC precede sinteza anticorpilor în toate infecțiile virale, dar în special în cazul *infecțiilor citolitice* în cursul cărora virusul se multiplică rapid. IMC are rol important în apărarea față de *infecțiile virale primare*, deoarece se activează într-un timp scurt și răspunde nevoilor de *apărare rapidă*, înainte de edificarea RIMH. În focarul inflamator indus de infecția virală se acumulează celule efectoare ale IMC, care ating *valoarea maximă la două zile* de la începutul multiplicării virale.

IMC se activează după ce virusul a pătruns în celulă și aceasta expune pe suprafața ei, antigene virale. Efectul este *liza* celulelor infectate și are rolul de a limita diseminarea virusului în mediul extracelular. Liza celulelor infectate cu virusuri citocide este protectoare numai dacă se produce rapid, înainte de asamblarea virionilor progeni. Liza tardivă are efect opus, deoarece favorizează diseminarea virusului. Pentru virusurile care produc infecții persistente, citoliza, timpurie sau tardivă, are efect protector.

IMC constituie modalitatea *strategică* de protecție antivirală, al cărei efect este liza celulei înainte de încheierea ciclului de multiplicare virală.

Limfocitele Tc activate sunt *specifice* față de virusul infectant. De exemplu, limfocitele Tc sensibilizate față de virusul variolei, lizează numai celulele infectate cu acest virus. Nu lizează celulele normale și nici, *in vitro*, celule alogenice infectate cu același virus.

În infecția *secundară*, răspunsul celulelor Tc este rapid, mediat de celulele Tc de memorie. Celulele de memorie pot să persiste în absența antigenului specific, probabil datorită stimulării sporadice nespecifice, de citokinele eliberate local în timpul reacțiilor față de antigenele neînrudite.

Dacă răspunsul imun adaptativ nu neutralizează agentul infecțios, infecția devine cronică sau latentă.

Imunopatologie. Virusurile, prin natura parazitismului lor, produc de cele mai multe ori, moartea celulelor infectate, asociată cu disfuncția țesutului lezat. Uneori însă, celulele nu mor din cauza virusului infectant, ci ca rezultat al RI antiviral. În unele infecții, în special al celor necitopatice, leziunile tisulare nu sunt cauzate de multiplicarea virusului, ci sunt produse de limfocitele Tc activate. Modelul experimental este LCMV infecțios pentru șoarece, care produce leziuni tisulare minime, dar activează intens IMC. Infecția puilor nou-născuți este ne-citolitică, persistentă, datorată inducerii stării de toleranță. Sistemul imunitar este imatur și nu activează răspunsul limfocitelor Tc. La șoarecele adult, infecția pe cale extranevraxială este asociată cu un proces patologic minim sau chiar absent, pentru că limfocitele Tc elimină celulele infectate cu virus. Inocularea intracerebrală (ic) secundară a animalelor produce o inflamație minimă a meningelui. Inocularea ic la șoarecele neimunizat produce *corio-meningita* (inflamația plexului coroid ventricular, a epiteliului ependimar și a leptomeningei – piamater și arahnoida măduvei). Virusul nu lizează corio-meningele. Moartea animalelor este cauzată de limfocitele Tc anti-LCMV. Șoarecii cu deficit funcținal al celulelor Tc devin purtători cronici de virus, dar leziunile patologice nu apar.

La om, infecția cu VHB are asemănări cu corio-meningita murină: indivizii imunodeficienți devin purtători cronici, maladia nu se manifestă și transmit infecția la persoanele sănătoase. În schimb, ficatul pacienților imunocompetenți, cu hepatită acută și cronică activă, este infiltrat cu un număr mare de limfocite T CD_8.

22.2.4. Mecanisme prin care virusurile evită efectorii răspunsului imun

În mediul extern, virusurile sunt instabile, datorită sensibilității la factorii de mediu. De aceea, pentru a se perpetua într-o populație de organisme sensibile, virusul trebuie să rămână cât mai mult în gazda infectată, ori să se transmită cât mai eficient de la o gazdă la alta. Pe de altă parte, efectorii răspunsului IMH și IMC nu sunt totdeauna eficienți în recunoașterea și eliminarea celulelor infectate cu virus, iar virusul eliberat din celulă trebuie să evite contactul cu efectorii răspunsului imun.

Mascarea epitopilor antigenici. Glicoproteinele învelișului viral sunt glicozilate de aparatul enzimatic al celulei. Astfel, sunt mascați epitopii antigenici ai moleculelor proteice și se evită detectarea lor, diminuând activitatea neutralizantă a Ac.

Cele mai subtile mecanisme de evitare a efectorilor imunitari se găsesc la virusurile care produc *infecții persistente*.

Aproape toate virusurile care *infectează persistent*, exprimă într-o măsură limitată informația lor genetică. Celulele infectate *persistent* exprimă o cantitate limitată de antigene virale pe suprafața lor, comparativ cu celulele în care ciclul de multiplicare virală este litic. O celulă care expune pe suprafața ei un număr mic de situsuri antigenice poate să scape lizei, deoarece situsurile antigenice distanțate nu permit legarea celor două situsuri de combinare ale moleculei de anticorp, necesară activării complementului. Acesta pare a fi mecanismul de supraviețuire a celulelor infectate cu LCMV, cu virusul rujeolei sau cu virusul hepatitei B. În neuroni, HSV exprimă un set restrâns de gene: proteinele virale sunt practic absente, neuronii nu expun Ag virale și scapă detectării de către efectorii sistemului imunitar, chiar în intervalul în care RI are intensitate maximă. Starea de latență a virusurilor herpetice este defavorabilă propagării virusului și, după ce răspunsul imun se relaxează, virusul se poate reactiva. Latența este întreruptă de *infecția productivă*, timp de câteva zile, în celulele epiteliale permisive. În scurtele perioade de multiplicare sunt produse cantități mari virus, care să-i permită diseminarea la alte organisme.

Celulele infectate persistent manifestă fenomenul de *fluctuație cantitativă* a antigenului viral, expus pe suprafața lor. Celulele infectate cu virusul rujeolic trec succesiv prin cicluri de dispariție și reapariție a antigenelor virale, asociate membranei citoplasmatice, în timp ce moleculele normale ale celulei nu au variații cantitative semnificative. Fenomenul se numește *modulație antigenică.*

Uneori, virusurile persistente infectează țesuturi cu *statut imunitar privilegiat.* SNC este un astfel de țesut, deoarece bariera sânge-creier limitează traficul limfocitar, iar neuroniii nu exprimă moleculele CMH I și II și după o posibilă infecție nu pot fi detectați de limfocite. Limfocitele T efectoare sau de memorie pot să traverseze bariera sânge-creier, dar nu există semnalele activării unui RI specific anti-viral. De exemplu, virusul rabic, după ce se multiplică în neuroni, parcurge traseul invers prin prelungirile nervoase și infectează celulele glandelor salivare. Leziunile neuronale sunt asociate cu modificarea comportamentului animalului, care devine agresiv, ceea ce ușurează diseminarea virusului prin mușcătură.

Epiteliile sunt situsuri privilegiate, deoarece sunt protejate de membrana bazală și sunt greu accesibile efectorilor imunitari – anticorpi și lifocite T. *Poliomavirusurile BK* și *JC* persistă în epiteliul calicelor renale, al pelvisului renal, al ureterelor și vezicii urinare, în prostată, pentru perioade lungi, cu eliberare de virus progen, iar EBV și CMV persistă în celulele epiteliale ale glandelor salivare.

Papilomavirusurile infectează cheratinocitele și persistă în țesutul epitelial al epidermei. Virusul papiloma bovin și cel uman codifică proteine ce interacționează direct cu calea endocitară de prelucrare a Ag.

22.2.4.1. Toleranța și/sau diminuarea reactivității imunitare

Exemplul clasic al inducerii toleranței este al *virusului corio-meningitei limfocitare* (LCMV), care, la șoarecii infectați *in utero, elimină selectiv clonele de limfocite specifice* și produce o infecție persistentă cu viremie, pentru tot restul vieții. *Antigenele virusului hepatitei B* se sintetizează în mare exces și se elimină din hepatocite, sub forma particulelor fără genom. Excesul cantitativ de antigene virale determină fenomenul de *toleranță imunitară.* Virusul se transmite prin placentă, când sistemul imunitar este imatur și fătul devine tolerant la antigenele virale. Se crede că hepatocitele omoară celulele TCD_8 specifice pentru HBV: citokinele inflamatorii pot induce expresia FasL pe hepatocite, iar limfocitele TCD_8 activate exprimă receptorul Fas. Rezultatul interacțiunii poate fi moartea apoptotică a limfocitelor sau a hepatocitelor. Infecția cu HBV în timpul dezvoltării fetale, produce infecții persistente productive.

În majoritatea *infecțiilor persistente*, virusurile infectează *celulele sistemului imunitar*: virusul hepatitei B, papovavirus, HSV, virusul Epstein-Barr, CMV, virusurile rubeolei, rujeolei, oreionului, influenza, parainfluenza, HTLV I, II, HIV. Uneori celulele infectate mor, diminuând potențialul reactiv imunitar.

Adenovirusurile codifică o proteină de 19 kDa (E_{19}), care se asociază cu domeniile α_1, α_2 ale *moleculelor CMH I* și blochează transportul lor spre suprafața celulei, iar două proteine codificate de CMV uman dislocă proteinele CMH I din reticulul endoplasmic, în citoplasmă, unde sunt degradate

rapid. Astfel, celula infectată care nu exprimă molecule CMH I nu este recunoscută de limfocitele T. Proteinele Vpu şi Tat, codificate de lentivirusuri, pot să interfere cu sinteza moleculelor CMH I.

Unele CMV codifică o moleculă omologă cu proteinele CMH I, care intră în competiţie pentru legarea şi prezentarea antigenelor peptidice.

Inhibiţia lizei celulei ţintă mediată de celulele T. Celulele T omoară celulele ţintă, infectate cu virus, prin activarea morţii celulare programate (PCD). Unele proteine codificate de virus blochează PCD şi celula rămâne viabilă, suport al multiplicării virale.

22.2.4.2. Variaţia antigenică

Virusurile, în special cele cu genom ARN, suferă *evenimente mutaţionale* cu o frecvenţă mare, iar în condiţiile presiunii selective de apărare specifică, variantele antigenice apar cu rapiditate. Virusurile care produc infecţii persistente la om (HIV, EBV, VHB, VHC) generează *variante antigenice noi*, care scapă mecanismelor recunoaşterii de către efectorii RI.

Variaţia antigenică constă în faptul că diferitele izolate ale aceluiaşi virus au o reactivitate variabilă cu serul imun standard. Virusul omolog (cel utilizat ca antigen pentru obţinerea serului imun) reacţionează optim cu serul imun standard, dar alte tulpini ale aceluiaşi virus reacţionează diferit, de la un grad înalt până la 0. Lipsa reactivităţii se datorează apariţiei unui alt tip sau subtip antigenic, iar reactivitatea intermediară defineşte grupele antigenice sau serotipurile.

La baza variaţiei antigenice stă selecţia mutantelor virale rezistente la acţiunea Ac. Virusurile cu genom ARN au cea mai înaltă rată a variaţiei antigenice. Mutaţiile nu sunt induse de Ac, dar apar în populaţia virală şi sunt selectate după ce Ac neutralizează virusul de tip sălbatic.

* Rata înaltă a mutaţiei constă în funcţia ARN-polimerazei, lipsită de activitatea de corectare a erorilor (3'proof-reading), astfel că încorporarea unei baze greşite nu este corectată, iar mutantele aleatorii (quasispecii) se găsesc în orice populaţie virală.

Astfel, rhinovirusurile se găsesc în peste 100 de variante antigenice. După infecţie, memoria imună este de scurtă durată, deoarece omul se poate infecta cu oricare dintre cele peste 100 de serotipuri, dacă este expus.

Virusul influenza A evită efectul neutralizant al anticorpilor specifici, prin rata înaltă de mutaţie a *ARN-polimerazei.* Rezultă în mod constant variante antigenice (biochimice) noi ale HA şi într-o măsură limitată, ale NA. Evoluţia pare a fi unidirecţională, deoarece variantele antigenice vechi au o şansă foarte mică să revină în circulaţie.

Noile variante antigenice ale HA şi NA trebuie să-şi păstreze funcţia, adică virionul trebuie să fie infecţios, dar nu este detectat de anticorpii preexistenţi. Fenomenul variaţiei antigenice limitate se numeşte *drift antigenic.*

Shiftul antigenic corespunde unei noi variante genetice a virusului gripal şi este rezultatul unei reasortări a genomului, care are loc cel mai probabil la porc, unde se produce co-infecţia cu un *virus uman* (ce infectează rareori păsările) şi cu o linie de *virus aviar.*

Virusul gripal nu produce o infecţie persistentă în organismul uman, dar apariţia sezonieră a variantelor asigură *persistenţa în populaţia umană.*

Glicoproteinele HIV suferă cea mai amplă variaţie antigenică. În fiecare organism uman infectat, prin fenomene mutaţionale, are loc driftul antigenic şi rezultă noi variante virale (*quasispecii*), care la rândul lor suferă noi mutaţii, rezultatul fiind diversificarea antigenică radiară.

Dacă apariţia mutantelor la ribovirusuri este explicată satisfăcător, constanţa antigenică a altora este surprinzătoare. Poliovirusul, virusul febrei galbene, *Rubivirus*, ca şi unele paramixovirusuri (virusul rujeolei, oreionului), sunt stabile antigenic.

Dezoxiribovirusurile sunt mult mai constante din punct de vedere genetic, deoarece în ciclul multiplicării acumulează mutaţii cu o rată mult mai mică. ADN-polimeraza corectează erorile: sinteza se opreşte până ce baza încorporată greşit este excizată prin activitate 3'exonucleazică. Totuşi, în evoluţie, virusurile ADN au acumulat mutaţii, iar altele au o rată înaltă a recombinării, ceea ce duce la diversitate antigenică: *Papiloma*, parvovirusul canin. Diversitatea antigenică generează tablouri epidemiologice diferite: cele mai multe virusuri există sub forma mai multor serotipuri care se 'rotesc' în populaţia sensibilă şi generează valuri epidemice. Pe măsură ce Ac specifici faţă de un serotip se acumulează în populaţie, un alt serotip, rezistent la acţiunea Ac, produce infecţia.

Interferența cu funcțiile citokinelor. Virusurile întrerup sinteza sau contracarează acțiunea *citokinelor* pe următoarele căi:

- prin sinteza unor proteine *asemănătoare citokinelor* şi se leagă de aceiaşi receptori. VEB codifică o proteină omologă citokinei IL-10, ce inhibă sinteza IL-12 şi generarea răspunsului Th1 (represia activității macrofagelor şi a IMC);
- prin sinteza unor proteine *asemănătoare receptorilor de citokine* şi neutralizează acțiunea citokinelor. Poxvirusurile codifică sinteza unor molecule solubile cu rol de receptori pentru citokine (TNF, IFN γ şi IL-1), denumiți *virokine*. Aceste molecule sunt eliberate din celulele infectate şi funcționează ca antagonişti competitivi ai citokinelor;
- prin *interferența directă cu sinteza* citokinelor;
- *contracararea efectelor inhibitorii ale IFN* asupra ciclului de multiplicare virală. Virusurile induc sinteza IFN şi sunt ținta principală a acțiunii acestuia. Un virus care induce sinteza IFN şi este foarte sensibil la acțiunea sa inhibitorie, nu se poate propaga. Evoluția a favorizat virusurile care contracarează efectele IFN. Unele dezoxiribovirusuri codifică proteine ce *inhibă căile majore de transducere* a semnalelor induse de IFN. Astfel, adenovirusurile codifică proteina E_1, care inhibă semnalul indus de IFN α, β sau γ şi proteine care antagonizează PKR. Virusurile cu virulență înaltă *inhibă sinteza ARN celular* şi a proteinelor (efect de întrerupere), ceea ce interferă cu capacitatea celulei de a produce IFN şi de a răspunde la acțiunea lui.

Bibliografie

1. Neurath A. R. 2008. Immune response to Viruses: Antibody mediated Immunity, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, 2008, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.
2. Carmichael A., Patrick Sissons P. J. G. 1998. Viruses, Immunity to, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed., ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.
3. Hislop A. D., Taylor G. S., Sauce D., Rickinson A. B. 2007. Cellular Responses to Viral Infection in Humans: Lessons from Epstein-Barr Virus – Annu. Rev. Immunol. 25: 587–617.
4. Seet B. T., Johnston J. B., Brunetti C. R., Barrett J. V., Everett H., Cameron C., Sypul J., Nazarin S. H., Lucas A., McFadden G. 2003. Poxviruses and Immune Evasion. Annu. Rev. Immunol. 21: 377–423.
5. Biron C. A., Nguyen K. B., Pien G. C., Cousens L. P., Salazar-Mather T. P. 1999. Natural Killer Cells in Antiviral Defense: Function and Regulation by Innate Cytokines. Annu. Rev. Immunol. 17: 189–220.
6. Tortorella D., Gewurz B. E ., Furman M. H., Schust D. J., Ploegh H. L. 2000. Viral Subversion of the Immune System – Annu. Rev. Immunol. 18 : 861–926.
7. Kohlmeiere J. E., Woodland D. L. 2009. Immunity to Respiratory Viruses – Annu. Rev. Immunol. 27: 61–82.
8. Sissons J. G. P., Oldstone M.B. 1985. Host Response to Viral Infections, în vol. Virology, ed. by B. N. Fields et al., Raven Press, New York.
9. Whitton J. L., Oldstone M. B. A. 1996. Immune Response to Viruses, în vol. Fields Virology, third Edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et. al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.
10. Whitton J. L., Oldstone M. B. A. 1990. Virus-Induced Immune Response Interactions. Principles of Immunity and Immunopathology, în vol. Virology, Second Edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.
11. Yewdell J. W., Mansour Haeryfar S. M. 2005. Understanding Presentation of Viral Antigens to CD_8^+T Cells in vivo: The Key to Rational Vaccine Design – Annu. Rev. Immunol. 23: 651–682.
12. Guidotti L. G., Chisari F. V. 2001. Noncytolitic Control of Viral Infections by the Innate and Adaptive Immune Response . Annu. Rev. Immunol. 19: 65–91.
13. Welsh M. R., Selin L. K., Szomolanyi-Tsuda E. 2004. Immunological Memory to Viral Infections. Annu. Rev. Immunol. 22: 711–743.
14. Weltzin R., Monath T. P. Intranasal Antibody Prophylaxis for Protection against Viral Disease. Clinical Microbiol. Rev. 12: 383–393.
15. Mogensen S. C. 1979. Role of Macrophages in Natural Resistance to Virus Infections. Micr. Rev. p. 1–26.
16. Mak T. W., Saunders M. E. 2006. Immunity to Pathogens, în vol. The Immune Response. Basic and Clinical Principles, 2006, Elsevier Academic Press.
17. Air G. M., West J. T. 2008. Antigenic Variation, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.
18. Zajac A. J., Harrington L. E. 2008. Immune Response to Viruses: Cell Mediated Immunity, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.
19. Oldstone M. B. A. 2008. Immunopathology, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

23. NOŢIUNI GENERALE DE ONCOGENEZĂ

Orice hipertrofie* localizată a unui ţesut, poartă denumirea de *tumoră***. Ea poate fi determinată de o proliferare celulară sau de inflamaţie. O tumoră determinată de proliferare celulară se numeşte *neoplasm* (creştere nouă). Cancerul este o creştere anormală a celulelor produsă de schimbări multiple în expresia genelor, ce tulbură echilibrul între proliferarea celulară şi moarte, generând o populaţie de celule ce invadează ţesuturile învecinate şi metastazează la distanţă, producând morbiditatea şi moartea gazdei. Neoplaziile s-au descris la toate încrengăturile de organisme (cnidari, echinoderme, cefalopode, amfibieni, păsări), cu excepţia nematodelor şi rotiferilor.

* Schimbările tisulare normale sunt: *hiperplazia* (sunt produse mai multe celule decât cele pierdute: de exemplu, hiperplazia sânului în timpul sarcinii); *metaplazia* (este produs un tip diferit de celule, de exemplu, ţesutul bronşic al fumătorilor, unde se diferenţiază celule squamoase şi nu cele tipice ale epiteliului respirator); *displazia* (celule nediferenţiate sau parţial diferenţiate apar alături de cele diferenţiate).

** Examinarea postmortem a pacienţilor în Grecia antică a relevat că ţesuturile normale sunt invadate de ţesutul tumoral. Creşterea tumorală invadantă se aseamănă cu picioarele unui crab şi de aici a derivat denumirea de cancer (cancer, lb. latină = crab).

Neoplasmele neinvazive rămân localizate la locul formării şi se numesc *benigne*. Celulele benigne se aseamănă cu celulele normale, atât din punct de vedere structural cât şi funcţional. Tumorile benigne sunt înconjurate de o *capsulă fibroasă* şi sunt uşor eliminate prin excizie chirurgicală. In nomenclatura clinică sunt notate cu sufixul *oma*: *lipoma* (ale ţesutului gras), *neuroma* (ale ţesutului nervos), *adenoma* (ale ţesutului glandular), *angioma* (ale celulelor vasculare sanguine şi limfatice), *fibroma* (ale fibroblastelor ţesutului conjunctiv), *condroma* (ale celulelor cartilaginoase). Ele pun viaţa în pericol, numai dacă sunt foarte voluminoase sau dacă secretă în exces substanţe active, ca de exemplu, hormoni.

Tumorile *maligne* sunt letale în mod direct. Masa tumorală este dezorganizată şi rareori delimitată de capsula fibroasă. Tumorile sunt *invazive*, adică invadează şi distrug arhitectura normală a ţesuturilor învecinate. Celule izolate migrează la distanţă de situsul de origine şi iniţiază noi centre de proliferare. Diseminarea celulelor tumorale şi constituirea unor focare de creştere şi multiplicare *secundară* se numeşte *metastazare* (schimbare a localizării).

Gradul de diferenţiere realizează un gradient, de la celulele *stem* (nediferenţiate), până la celule mature (diferenţiate). Tumorile ale căror celule sunt puţin diferenţiate (anaplastice) sunt mai agresive (malignitate de nivel înalt).

Celulele tumorale păstrează o oarecare asemănare cu tipul celular normal de origine şi de aceea este posibilă clasificarea lor după raportul cu ţesutul normal. Tumorile care îşi au originea în *celulele epiteliale ectodermice sau endodermice* sunt incluse în categoria *carcinoamelor* (adenocarcinoma = tumori maligne de origine epitelială glandulară), iar cele originare în *celulele mezenhimale* se numesc *sarcoame* (osteosarcom = tumoră a ţesutului conjunctiv osos (rabdomiosarcom = tumoră malignă a muşchilor scheletici sau tendoanelor).

Denumirea de *blast* se foloseşte pentru tumorile foarte maligne ale vârstei copilăriei. Celulele sunt nediferenţiate şi se aseamănă cu celulele *blastocist* (blastulă). In categoria blastoamelor intră *neuroblastoma (din neuroblaste), retinoblastoma, nefroblastoma* (din celulele embrionare renale).

Leucemiile sunt malignităţi ale leucocitelor (*leukemia* = sânge alb) şi constituie o categorie specială a sarcoamelor.

Stadializarea tumorilor* se face în raport cu următoarele criterii:

* De exemplu $T_2N_1M_o$ semnifică o tumoră primară de dimensiuni medii, diseminată într-un set de ganglioni limfatici, fără metastaze.

BCU "CAROL DAVILA" UNIVERSITY LIBRARY

– *dimensiunile* tumorii primare (T): de la mici (T_1), până la mari (T_4) ;
– numărul (N) de *ganglioni limfatici* implicaţi: N_0 (fără implicare ganglionară); N_1 şi N_2 (mai mulţi ganglioni infiltraţi), N_3 (implicare ganglionară extinsă);
– *metastazarea* pe cale sanguină (M): M_o (fără metastaze); M_1 (tumori secundare la distanţă în organe sau în ţesuturi).

Pe baza caracterelor TNM, tumorile se clasifică în stadii evolutive:
– stadiul I – tumoră mică, se îndepărtează chirurgical;
– stadiul II – operabil, dar riscul diseminării ulterioare este semnificativ;
– stadiul III – tumora a invadat ţesuturile înconjurătoare şi nu mai poate fi operată uşor;
– stadiul IV – diseminare metastatică la situri îndepărtate.

Evenimentul primordial al maladiei este procesul biologic al *transformării maligne a celulei.* Cauzele care determină transformarea malignă, sunt multiple şi incriminarea uneia sau alteia este însoţită de numeroase incertitudini. Maladia neoplazică nu este unică, ci prin diversitatea substratului celular de origine, a factorilor transformanţi, a stadiului fiziologic al celulei în momentul transformării maligne, include *un număr nelimitat* de maladii.

23.1. Agenţii fizici şi chimici ai malignizării

Transformarea malignă este rezultatul acţiunii convergente a numeroşi factori de mediu extern şi intern, care interacţionează şi se influenţează reciproc:
– *factori umorali* (în special hormoni din sfera genitală);
– *substanţe chimice* de origine industrială (inclusiv numeroase substanţe de uz farmaceutic);
– *substanţe alimentare* modificate chimic prin prelucrare neadecvată;
– *factori fizici* (radiaţii ultraviolete (UV), radiaţii ionizante, traumatisme);
– *factori biologici* (virusuri).

Evenimentul declanşator al malignizării celulare este *mutaţia somatică.* Alterarea mutaţională a ADN este cauza fundamentală a malignizării. Celulele somatice sunt cele ce nu sunt destinate să devină celule sexuale. Un argument indirect al rolului mutaţiilor este creşterea incidenţei tumorilor, odată cu vârsta, fapt explicabil prin necesitatea acumulării mutaţiilor somatice, înainte de producerea malignizării.

Factorii interni sau externi care produc mutaţii şi favorizează transformarea malignă a celulelor poartă denumirea de *carcinogeni.*

Dintre factorii fizici, *radiaţiile UV* şi *ionizante* sunt foarte mutagene. Expunerea tegumentului la lumină UV cauzează producerea neoplaziei tegumentare, iar razele x aplicate la nivelul tiroidei produc cancer tiroidian. Majoritatea celulelor expuse acţiunii agenţilor mutageni, suferă leziuni incompatibile cu supravieţuirea, dar un număr foarte mic dintre ele se malignizează.

Radiaţiile UV pot fi absorbite de bazele ADN şi produc modificări chimice. Cea mai comună modificare este formarea *dimerilor* între resturile pirimidinice adiacente pe o catenă sau între resturi situate pe cele două catene opuse. Dimerii interferă cu transcrierea şi replicarea. Majoritatea bacteriillor care supravieţuiesc iradierii cu UV nu sunt mutante, ceea ce denotă că efectul mutaţional al iradierii este produs în primul rând, în timpul reparării şi nu ca o consecinţă primară a iradierii.

Radiaţia ionizantă produce ruperi ale catenei de ADN. Capacitatea radiaţiei ionizante de a produce malignităţi umane, în special leucemii, a fost evidenţiată dramatic de creşterea ratei leucemiei la supravieţuitorii exploziei bombelor atomice din cel de al II-lea război mondial.

Ambele tipuri de radiaţii pot produce neoplazii *in vivo* şi transformarea celulelor *in vitro.*

Carcinogeneza chimică. Se disting două categorii mari de carcinogeni: cu acţiune *directă* şi *indirectă.*

Carcinogenii cu acţiune *directă* sunt definiţi prin proprietatea lor de *reactivitate electrofilă,* adică sunt compuşi ce reacţionează cu grupările *încărcate negativ* ale altor compuşi.

Agenţii chimici cu acţiune *indirectă* sunt convertiţi la carcinogeni, după dobândirea grupărilor electrofile. Activarea metabolică a carcinogenilor este catalizată de enzimele hepatice, ce detoxifică substanţele toxice ce pătrund în organism: medicamente terapeutice, insecticide, hidrocarburi

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

policiclice şi chiar unele produse naturale liposolubile. Sistemul de detoxifiere produce solubilizarea, adică adaugă *grupe hidrofile* la compuşii insolubili în apă. Procesul de detoxifiere începe cu o serie de reacţii de oxidare, catalizate de enzimele asociate membranelor reticulului endoplasmic. Enzimele pot să oxideze compuşi nereactivi, aşa cum sunt hidrocarburile aromatice policiclice. Prin oxidarea compuşilor aromatici policiclici rezultă un *epoxid*, un *grup electrofil** foarte reactiv. De obicei, epoxizii sunt rapid hidrolizaţi la grupări OH (sub acţiunea enzimei epoxid-hidratază), apoi cuplaţi cu acidul glucuronic sau cu alte grupări, rezultând produşi solubili în apă, ceea ce permite excreţia.

* Epoxidul este un grup funcţional ce constă dintr-un inel cu 3 atomi: 2 atomi de C şi unul de oxigen. Moleculele *electrofile* sunt acelea care conţin *centre pozitive* şi pot reacţiona cu molecule *nucleofile* celulare (molecule care conţin *centre negative*): glutation, proteine, acizi nucleici.

Unii intermediari epoxizi sunt hidrolizaţi mai lent la grupările OH, timp în care cei electrofili şi reactivi acţionează şi îşi manifestă potenţialul carcinogen. Moleculele electrofile pot interacţiona cu grupările încărcate *negativ* ale mai multor tipuri de molecule (proteine, ARN, ADN). Interacţiunea compuşilor electrofili cu ADN este *mutagenă* şi *carcinogenă*.

Mutagenii chimici şi carcinogenii pot produce mutaţii punctiforme, schimbări ale cadrului de citire, ruperi ale catenelor ADN şi aberaţii cromosomale în celulele mamiferelor.

Caracterul mutagen al agenţilor chimici este testat faţă de bacterii. Potenţialul mutagen al unui compus chimic este direct proporţional cu potenţialul carcinogen. De aceea, mutageneza faţă de bacterii a devenit test pentru carcinogeni. Cel mai cunoscut este *testul Ames*. Potenţialul carcinogenic real al unui compus chimic este testat pe animale.

23.2. Etapele procesului de malignizare

Carcinogeneza parcurge câteva stadii: *iniţiere, promoţie, progresie şi conversia malignă.*

În stadiul de *iniţiere*, ADN suferă, cel mai adesea, o alterare nucleotidică. De cele mai multe ori, nucleotidul alterat (adduct) sub acţiunea factorilor mutageni, ori nu produce consecinţe asupra codului genetic al celulei, ori este reparat. Proteinele celulei nu sunt alterate structural sau funcţional. Alteori mutaţia se datorează ruperii unei catene, dar poate fi reparată enzimatic, fără consecinţe negative.

Uneori, alterarea nucleotidică sau ruperea unei catene introduc o modificare ce nu poate fi reparată şi modifică o proteină implicată în reglarea creşterii şi diviziunii celulare. Celula poate dobândi un avantaj al ratei de creştere. O astfel de celulă a parcurs stadiul de *iniţiere* şi devine ţintă a malignizării. Schimbarea genetică în celulă şi iniţierea sunt ireversibile.

Promoţia implică expunerea celulei intacte la un stimul ce favorizează proliferarea selectivă. Rezultă astfel o *clonă de celule preneoplazice*, alterate genetic. Promoţia este reversibilă. Dacă stimulul este îndepărtat, clona celulară suferă procesul de regresie.

Progresia se datorează unui eveniment genetic suplimentar, care apare într-o celulă a clonei preneoplazice şi este consecinţa instabilităţii genetice a unei gene reglatoare. Mutaţiile secundare pot să apară spontan sau sunt produse de factorii de mediu. Clona preneoplazică devine *clonă neoplazică*, cu un avantaj semnificativ al ratei de creştere faţă de celulele normale. Avantajul creşterii poate fi dependent de un hormon sau de un agent patogen infecţios. Dacă factorul stimulator este îndepărtat, tumora regresează.

Conversia malignă este completă dacă una dintre celulele neoplazice dobândeşte o mutaţie suplimentară, inclusiv o mutaţie care face ca ea să devină invazivă şi metastazantă. Sunt selectate cele mai agresive celule, care produc tumora primară. Tumora primară trebuie să inducă *angiogeneza*: celulele sale secretă un factor de creştere a endoteliului vascular (VEGF), cu acţiune mitogenă asupra celulelor endoteliale.

Metastazarea semnifică detaşarea unei celule din masa tumorii primare, deplasarea prin ţesuturi şi supravieţuirea în noul mediu. Celulele metastazante aderă de membrana bazală a ţesutului în care s-a format tumora primară şi invadează matricea extracelulară. Celulele tumorale invadează celulele endoteliale ale unui vas sanguin local. In lumenul vasului, celulele metastazante circulă până aderă la endoteliu, într-o altă parte a organismului. Celulele metastazante parcurg drumul invers, se extravazează din circulaţie şi trec în matricea extracelulară, unde iniţiază creşterea tumorii secundare.

Celula metastazantă are proprietăți alterate de aderență, migrare și supraviețuire. O moleculă importantă pentru metastazare este CD_{44}. CD_{44} este esențială pentru migrarea orientată a celulelor T, dar este exprimată și pe alte celule cu originea în măduva osoasă sau extramedulară. Migrarea celulelor tumorale este preferențială în anumite țesuturi, condiționată de diferite citokine și de receptorii lor.

Unii agenți chimici inductori ai neoplaziei acționează sinergic. In concepția modernă, unii carcinogeni chimici au rolul de *inițiatori* ai malignizării. Inițiatorii sunt carcinogeni care acționează prin efectul lor *mutagen*, dar singuri, de obicei, nu produc malignizarea (deși uneori acționează atât ca inițiatori cât și ca promotori), deoarece mecanismele de reparare a ADN sunt eficiente (acționează rapid și fără erori). Efectul inițiatorilor este desăvârșit de agenți chimici diferiți, denumiți *promotori*. Promotorii nu sunt mutageni, dar mimează efectele factorilor de creștere, deoarece stimulează diviziunea celulară și expresia alterată a genelor. Pentru a fi eficient, promotorul trebuie să fie aplicat după inițiator, în mod repetat, timp de săptămâni sau luni, iar inițiatorul trebuie aplicat o singură dată. Cei mai cunoscuți promotori sunt esterii forbolului. Promotorul nu poate modifica metabolismul celulei, decât consecutiv acțiunii inițiatorului. Rezultatul acțiunii sale poate fi alterarea ADN sau schimbarea stării de diferențiere a celulei. Gudroanele rezultate din arderea țigaretei par a avea acțiune carcinogenă de tipul promotorului.

S-au identificat sute de gene, care, consecutiv unui proces mutagen produc creșterea necontrolată. In ultimii ani, tot mai multe dovezi sugerează că mutațiile genice nu sunt singurele cauze inductoare ale neoplaziei. Adăugarea anumitor grupări chimice la ADN sau la proteinele asociate, poate altera activitatea genică, rezultatul fiind, uneori, malignitatea. S-a raportat că proteina oncogenă mutantă implicată în leucemia acută promielocitară (APL) mobilizează enzime care atașează *grupările metil la ADN* (probabil la secvența genică supresoare a tumorii). Metilarea ADN inhibă activitatea genei și contribuie la transformarea malignă a celulei leucemice. Descoperirea explică *metilarea genelor în celulele maligne*. Genomul celulelor maligne are mai puține grupări metil decât celulele normale, dar genele particulare – inclusiv genele supresoare ale oncogenelor, a căror inactivare induce creșterea celulară excesivă – adeseori sunt mai metilate.

23.3. Caracterele generale ale celulelor normale

Cultivarea celulelor a permis stabilirea unor diferențe, nu totdeauna discriminatorii, între celulele normale și maligne. Se disting 3 tipuri de culturi celulare:

– *culturi primare*, obținute prin dispersia celulelor tisulare cu tripsină (cresc câteva pasaje);

– *linii celulare diploide* denumite și *culturi secundare* se obțin prin pasajul culturii primare. Celulele au suferit o schimbare ce le permite cultivarea limitată (circa 10 pasaje pentru celulele epiteliale și aproximativ 50 de pasaje pentru fibroblaste), dar își păstrează caracterul diploid. După numărul limitat de generații, celulele devin senescente*, mor și cultura se pierde (stadiul 1 de *criză*). Este un raport între durata proliferării *in vitro*, vârsta individului donor și durata de viață a speciei. Liniile celulare de la embrioni și de la organisme tinere trăiesc mai mult decât liniile de la organismele vârstnice, iar cele de la speciile cu viață lungă trăiesc mai mult decât cele de la speciile cu viață scurtă, deși corelațiile nu sunt stricte. Uneori, un număr mic de celule rămân viabile și se multiplică, inițial cu o rată scăzută, dar dacă sunt menținute în cultură chiar pentru mai multe luni, se divid și formează o *linie celulară stabilizată*;

* Senescența este explicată prin scurtarea progresivă a telomerei, pe măsură ce progresează numărul ciclurilor de diviziune, *in vitro* și *in vivo*. Telomerele sunt structurile de la capetele cromosomilor lineari ai eucariotelor și constau din multe copii în tandem ale unei secvențe repetate de nt, de tipul TxGy pe o catenă și CyAx pe catena complementară (x și y variază între 1-4). Telomerele au lungimi variabile, de la câteva zeci de pb, la zeci de mii de pb la mamifere. Secvența TG este mai lungă decât complementul său, cu o regiune de ADN mc de câteva sute de nt la capătul 3'. Scurtarea telomerei are rolul unui ceas molecular ce controlează capacitatea replicativă și intrarea celulelor în senescență. Rolul ei derivă din faptul că ADN-pol nu poate să replice complet capătul 3' al catenei lagging al moleculei lineare. *In vitro*, celulele mamaliene normale proliferează un număr limitat de generații. La limita superioară a numărului de cicluri, una sau mai multe telomere ajunse la dimensiunea critică, declanșează o oprire ireversibilă a creșterii, denumită senescență replicativă sau stadiu 1 de mortalitate (M 1).

Replicarea capetelor cromosomilor (telomere) este catalizată de complexul *telomerazei* și necesită matriță și primer.

Telomeraza este o ribonucleoproteină alcătuită din 2 componente esențiale:

– ARN funcțional, care servește ca matriță pentru sinteza catenei TxGy a ADN telomeric;

– proteină catalitică (hTERT) cu activitate de RT.

Telomeraza este o ADN-pol dependentă de ARN (RT celulară) și oferă situsul activ pentru sinteza secvențelor ADN telomerice dependente de ARN (în direcția 5'–3'), are rolul de a proteja capetele cromosomilor de enzimele degradative și aproape totdeauna constituie baza moleculară pentru potențialul nelimitat de proliferare. Spre deosebire de RT virală,

telomeraza copiază numai o secvență scurtă a ARN pe care o conține. Telomeraza are un rol important în senescența celulară. Activitatea telomerazei lipsește în cele mai multe celule somatice umane, dar este prezentă în peste 90% dintre celulele maligne și în celulele imortalizate *in vitro*.

În timpul fiecărui ciclu de replicare normală, telomerele se scurtează până când nu mai protejează ADN cromosomal și apoi celula moare. Dacă telomeraza este reglată la un nivel înalt, telomerele vor fi menținute deasupra lungimii critice, iar celulele devin nemuritoare. hTERT este, în general, represată în celulele normale și are activitate înaltă în celulele imortalizate. Celulele tumorale au potențial nelimitat de creștere, datorită telomerazei.

Telomeraza cooperează cu oncogenele sau inactivează antioncogenele și induce malignizarea celulelor epiteliale umane și a fibroblastelor.

– *liniile celulare stabilizate* derivă din liniile celulare diploide care scapă senescenței, activează o genă critică pentru ciclul celular (ca de exemplu, p53) și continuă să se dividă. Liniile celulare stabilizate sunt normale, diploide, dar se deosebesc de cultura de origine prin capacitatea de creștere și diviziune pentru perioade lungi de timp, până la o nouă scurtare a telomerei, când ajung la al II-lea blocaj replicativ denumit stadiul 2 de criză sau de mortalitate (M2), caracterizat prin mortalitate masivă, datorat telomerelor scurte și nefuncționale. Puține celule supraviețuiesc crizei din stadiul 2 și sunt capabile să păstreze lungimea telomerei prin activarea telomerazei. Telomeraza condiționează proliferarea celulară nelimitată, adică *imortalizarea*. Liniile imortalizate s-au obținut de la hamsterul sirian, chinezesc, maimuță și rareori de la embrionul uman sau de găină. Imortalizarea poate să fie indusă de iradiere, de oncogenele celulare, de gene virale (E_1 de la adenovirusuri, E_6, E_7 de la papiloma, de EBV);

– *liniile celulare transformate* își au originea în liniile celulare stabilizate sub acțiunea unui eveniment genetic de transformare malignă spontană sau sub acțiunea unui virus oncogen.

Celulele normale au o durată de viață, limitată în timp. Atât *in vivo*, cât și *in vitro*, ele realizează un număr limitat de cicluri de diviziune.

Diviziunea celulelor normale *in vitro* este strict dependentă de următoarele condiții:
– densitatea celulară;
– disponibilitatea factorilor de creștere;
– disponibilitatea unei suprafețe solide la care să adere.

Dependența creșterii de densitatea celulară, se manifestă prin fenomenul *inhibiției de contact*.

Inhibiția de contact sau creșterea dependentă de densitate definește capacitatea celulei normale de a recepționa stimuli din mediul extern și de a înceta diviziunea și mișcările (formarea de pseudopode) în condiții restrictive de spațiu. Consecința creșterii dependente de densitate este că, *in vitro*, celulele normale se divid numai atâta timp cât dispun de spațiul necesar, adică cresc numai până la contactul cu celulele vecine, formând un *monostrat*. Când monostratul este confluent, diviziunea se oprește. *In vitro*, celulele normale realizează o *creștere bidimensională*, iar *in vivo*, consecința creșterii limitate de spațiu este păstrarea riguroasă a arhitecturii țesutului și organului din care fac parte.

Inhibiția de contact este rezultatul unor mecanisme reglatoare complexe. Diviziunea celulelor normale, *in vivo*, este coordonată de semnale multiple din mediul extracelular, recepționate de molecule membranare specializate funcțional, cunoscute sub denumirea generică de *integrine*, adică molecule care integrează activitatea unei celule în contextul ansamblului structural din care face parte.

Denumirea de "integrină" s-a bazat pe concepția că aceste molecule au rolul unor punți de legătură între matricea extracelulară și citoschelet și mediază activitățile de răspuns ale celulei normale, în contextul conviețuirii ei cu celulele vecine.

Integrinele sunt proteine heterodimere transmembranare, cu un plan structural bine conservat. Subunitățile mari (α) conțin 3–4 secvențe repetitive, cu rolul de legare a cationilor și sunt alcătuite din trei domenii: extracelular, transmembranar și citoplasmatic. Subunitatea mică (β) a fiecărei integrine, are numeroase resturi de cisteină și se asociază necovalent cu subunitatea mare.

Celulele normale sintetizează și secretă numeroase componente moleculare, care formează *matricea*. Matricea poate lua forma unei simple *membrane bazale* care constituie suportul unui epiteliu, până la țesuturile conjunctive diversificate (piele, tendoane, ligamente). In structura ei se găsesc fibre (colagen și elastină) și polimeri solubili (proteoglicani*, fibronectină și glicoproteine).

* Proteoglicanii au unul sau mai multe lanțuri de glicozaminoglicani, atașate de o regiune centrală proteică și sunt localizați în celulă, intercalați în membrane și în matrice.

Fibronectina se găseşte atât în matrice cât şi în plasma sanguină. Este alcătuită din două subunităţi neidentice, legate prin punţi disulfurice. Multe tipuri de celule mezenhimale aderă prin fibronectină, iar celulele epiteliale şi endoteliale aderă prin *laminină.* Lamininele se găsesc în toate membranele bazale şi au influenţe majore asupra aderenţei, creşterii, migrării şi diferenţierii celulelor.

Domeniul citoplasmatic al integrinelor se conectează cu *citoscheletul,* acesta la rândul lui fiind mediatorul interacţiunilor celulă-celulă şi celulă-substrat.

Integrinele sunt molecule receptoare pentru un număr mare de molecule matriceale. Prin domeniul lor extern leagă diferite molecule din mediul matriceal şi extracelular şi transmit semnale în interiorul celulei, pe care le preia citoscheletul, cel care condiţionează comportamentul normal ("social") al celulei, care se materializează în fenomenul *inhibiţiei de contact.*

Filamentele de actină ce formează citoscheletul celulei normale au o distribuţie ordonată şi se ancorează pe faţa internă a membranei citoplasmatice. Filamentele citoscheletului preiau semnalele recepţionate de integrinele membranare din mediul extern. In celula normală, filamentele de actină au o orientare bine definită, ceea ce determină o formă constantă şi un anumit grad de rigiditate a acesteia.

Creşterea şi diviziunea celulelor normale *in vitro* este restrictivă în raport cu doi factori: *disponibilitatea factorilor de creştere* şi a *unei suprafeţe solide pentru aderenţă.*

Aportul factorilor de creştere este asigurat de serul* de origine animală, care trebuie adăugat la compoziţia mediului nutritiv. Celulele normale necesită concentraţii mari de factori de creştere deoarece au o capacitate limitată de transport intracelular al moleculelor nutritive şi metabolismul lor este aerob.

* Serul, un produs natural cu compoziţie chimică nedefinită şi calitate variabilă în funcţie de originea sa, oferă celulei factori de creştere, de aderenţă, hormoni, nutrienţi, ioni şi factori inhibitori ai tripsinei; tamponează mediul faţă de variaţiile pH şi are acţiune antitoxică.

Compoziţia serului este complexă. Numeroşi factori de creştere din ser sunt eliberaţi de plachete: PDGF (platelet derived growth factor) şi TGFb (transforming growth factor b) au efecte specifice faţă de anumite tipuri celulare. PDGF este mitogen pentru celulele derivate din mezoderm (fibroblaste) şi pentru astrocite (celule gliale). TGFb este citostatic pentru multe celule epiteliale.

Alţi factori de creştere: EGF (epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor), FSH, prolactina, tri-iodotirozina, estradiolul, prostaglandinele.

Serul conţine factori care condiţionează substratul (îi modifică sarcina electrică) şi favorizează aderenţa matricei extracelulare. Fibronectina solubilă din ser pare să aibă rol în aderenţa celulei la substrat.

Serul favorizează creşterea celulelor fibroblastice, mai mult decât a celulelor epiteliale în culturile din ţesuturile normale, ceea ce a stimulat căutarea unor formule de mediu fără ser.

Mediile fără ser conţin insulină, transferină saturată cu Fe, microelemente (Se, Cu, Zn, Mn, Mo, Ni, Va). Alte medii speciale fără ser, utilizate pentru stimularea proliferării celulelor epiteliale, conţin toxină holerică, hidrocortizon sau izoprenalină. Hidrocortizonul acţionează prin creşterea aderenţei pe calea inducerii sintezei proteoglicanilor. Toxina holerică şi izoprenalina cresc concentraţia intracelulară a AMPc, cu efect mitogen pentru unele celule epiteliale.

Precursorii lipidici – colesterolul, acidul linoleic, etanolamina şi fosfoetanolamina, HDL şi preparatele lipidice brute (lipide din soia) sunt adeseori incluse în mediile fără ser, având rol în biosinteza membranelor. Compuşii tiolici – β-mercaptoetanolul – se adaugă ca inhibitori ai stresului oxidativ prin radicalii liberi.

Dependenţa de suportul de *aderenţă* pentru creşterea *in vitro* este o condiţie absolută a celulelor normale (fibroblaste sau de tip epitelial). Dacă sunt menţinute în suspensie (prin agitare), chiar într-un mediu care conţine toţi factorii de creştere, rămân viabile un timp, dar nu cresc şi nu se divid.

Din punct de vedere genetic, celula normală este diploidă.

Particularitatea fundamentală a celulelor normale, este diviziunea cu o rată proprie fiecărui ţesut şi păstrarea arhitecturii normale a acestora.

23.4. Particularităţile funcţionale generale ale celulelor maligne

Transformarea malignă este un proces care se realizează în trepte şi implică cel puţin două clase de funcţii biologice. Prima este cea care determină *imortalizarea**, ceea ce semnifică stabilizarea celulelor *in vitro*, adică dobândirea potenţialului de creştere nelimitată. Imortalizarea nu este un indicator al transformării maligne, pentru că celulele se imortalizează înainte de expunerea la stimuli transformanţi. Stabilizarea unei tulpini celulare se poate face sub acţiunea unor stimuli şi depinde de

predispoziția naturală a celulelor de a dobândi imortalitatea. Celulele sanguine animale sunt imortalizate numai prin transformare, cele aderente umane sunt rareori stabilizate, iar cele de șoarece se stabilizează ușor.

A II-a clasă de funcții este cea care determină *transformarea malignă*, asociată cu modificări fenotipice și fiziologice. Uneori, chiar tumorile benigne progresează spre malignitate și stadiile timpurii ale malignizării sunt greu de identificat.

Distincția dintre celulele normale și cele transformate malign se bazează pe un set de caractere care nu sunt totdeauna evidente și acceptate:

– celulele tumorale pot crește chiar în suspensie;
– necesită o concentrație mai mică de ser sanguin în mediul de creștere;
– au suprafața alterată și membrana lor este mai fluidă;
– numărul de cromosomi este diferit de cel diploid (celulele pot fi triploide, tetraploide sau au extra copii ale unor cromosomi).

Pentru scopuri practice, *o celulă transformată, se definește prin caracterul permanent al creșterii sale, nelimitată în timp și prin capacitatea de a iniția creșterea tumorii, după transplantare la organismele singenice.*

Celula malignă este mai puțin diferențiată (este dediferențiată), adică a pierdut într-o măsură semnificativă particularitățile structurale și funcționale ale celulei normale de origine. De exemplu, celulele neoplazice hepatice pierd anumite enzime caracteristice celulelor hepatice normale, precum și cele mai multe funcții specifice ficatului.

Celulele maligne se pot distinge de celulele normale prin *analiză microscopică.* Ele posedă caracteristicile celulelor cu *creștere rapidă*, adică au un raport mare N/C, nucleoli proeminenți, mitoze frecvente și o specializare structurală redusă. Prezența celulelor invadante printre celulele normale învecinate este cel mai sigur indiciu al malignității.

Celula malignă este o celulă "anarhică, asocială și antisocială", care nu recunoaște celulele vecine și se divide în ritm propriu. Are aderență scăzută față de vecinele sale și din această cauză, are caracter *invaziv*, adică se desprinde de celulele învecinate, migrează la distanță printre celulele normale și inițiază un nou centru de creștere, la distanță de focarul inițial. Pentru migrare, ele produc atât receptori pentru proteinele membranei bazale, cât și enzime care degradează componentele structurale (colagenul, proteoglicanii, glucozaminoglicanii) ale membranei bazale. Celulele tumorale metastatice pot să adere de celulele endoteliale, ceea ce ușurează migrarea lor, dar în ultimă instanță ele părăsesc patul vascular și încep creșterea într-un mediu străin. Celulele metastatice trebuie să adere de noile tipuri celulare și să se multiplice.

O alterare comună care favorizează metastazarea implică interacțiunea intercelulară a moleculelor de caderină E. Cuplarea intercelulară a moleculelor de caderină E declanșează semnalele ce stopează creșterea, acționând ca supresori ai invaziei și metastazării. La majoritatea carcinoamelor, funcția caderinei E se pierde datorită mutațiilor genice.

Celulele maligne continuă să se dividă în condițiile în care, celulele normale răspund prin încetarea creșterii și diviziunii, atât *in vivo* cât și *in vitro*.

Diferențele dintre celulele transformate malign și cele normale se pot împărți în 4 categorii:

1) modificări ale modului de creștere;
2) modificări ale suprafeței celulare;
3) modificări ale componentelor intracelulare, ce rezultă din prezența genelor transformante;
4) modificări fiziologice;
5) modificări genetice.

l) Modificările *modului de creștere* includ:

a) creșterea la o densitate celulară superioară;
b) necesarul redus de factori de creștere în mediu;
c) diminuarea dependenței de suportul de creștere;
d) formarea tumorilor (tumorigeneza), după injectarea *in vivo*.

Densitatea celulară. Celulele maligne realizează, *in vitro*, densități mari pe unitatea de suprafață, de 5–10 ori mai mari decât celulele normale, deoarece, pierzându-și inhibiția de contact, cresc în straturi suprapuse. Creșterea lor este aglomerată (tridimensională). Pe suportul solid se

formează aglomerări de celule, denumite *microtumori*, iar *in vivo*, pierderea inhibiției de contact se reflectă în caracterul invaziv al creşterii şi în modificarea arhitecturii normale a țesutului.

Scăderea necesarului de factori de creştere. Celulele maligne au necesități scăzute pentru factorii de creştere. Spre deosebire de celula normală, creşterea celulei maligne este relativ independentă de factorii serici stimulatori (hormoni, vitamine, ioni de Ca^{2+}), pentru că produc un spectru de factori autocrini, ceea ce le conferă un grad de autonomie față de ser. Ele pot produce TGFα, cu efect mitogen, care anulează efectul citostatic al TGFb din ser.

Reducerea dependenței de ser este un criteriu pentru identificarea celulelor transformate. În absența serului în mediul de creştere, celulele normale se blochează în faza G_1 şi reiau ciclul după adăugarea serului, dar celulele transformate tind să progreseze în faza S_1, indiferent de concentrația serului.

Celulele tumorale se divid cu o rată foarte înaltă, la concentrații serice foarte puțin favorabile creşterii celulelor normale, deoarece mecanismele de transport membranar a nutrienților (glucoza, aminoacizi etc.) sunt de 5–10 ori mai eficiente, comparativ cu ale celulelor normale, fiind active chiar la concentrații foarte scăzute ale moleculelor nutritive.

Diminuarea dependenței față de suportul de creştere in vitro. Celulele maligne sunt mai puțin dependente de substratul de ancorare. Moleculele membranare de aderență există, dar frecvent prezintă modificări ale domeniului extracelular care modifică interacțiunea lor cu filamentele de actină. În consecință, celulele maligne pierd parțial sau total, dependența de suportul de creştere şi se divid în medii semisolide şi chiar lichide. Pierderea dependenței de ancorare de suport este foarte evidentă, chiar *in vivo*, pentru tumorile lichide (ascite).

Scăderea aderenței față de suport şi față de celulele vecine, creşterea accentuată a mobilității, abolirea capacității de recunoaştere selectivă a semnalelor din mediul extern se explică prin diminuarea cantitativă a integrinelor în membrana celulelor maligne. Datorită scăderii aderenței, celula tumorală se desprinde din angrenajul ei structural şi migrează la distanță, formând *metastaze.*

Acțiunea tumorigenă. Celulele maligne, după injectarea la organisme cu molecule de histocompatibilitate identice se divid şi produc tumori.

Celulele tumorale nu intră în apoptoză. Programul apoptotic este prezent, în formă latentă, în aproape toate celulele organismului. Rezistența la apoptoză este o caracteristică, probabil, a tuturor neoplaziilor. Calea evitării apoptozei este pierderea sau mutația p53, care acționează ca reglator proapoptotic. Gena p53 are rol de senzor ce recepționează mesajul lezării ADN.

În neoplazie, angiogeneza este un proces esențial pentru creşterea masei tumorale. Tumorile schimbă balanța inductorilor şi inhibitorilor angiogenezei, alterând expresia genică: de exemplu, creşterea expresiei VEGF stimulează angiogeneza.

2) *Modificările suprafeței celulare.* Probabil, cea mai importantă diferență a celulelor maligne, față de celulele normale, constă în *mobilitatea proteinelor* suprafeței celulare. Datorită acestui fapt, anticorpii pot mai uşor să aglutineze o proteină a suprafeței celulelor transformate. Alterarea legăturilor dintre proteinele de suprafață şi elementele citoscheletului, reprezintă baza alterării morfologiei celulelor transformate şi este probabil cauza mobilității proteinelor. Modificările suprafeței se exprimă astfel:

– creşterea gradului de aglutinabilitate cu lectinele din plante;

– modificarea cantitativă a glicoproteinelor şi glicolipidelor;

Lipidele membranare ale celulelor maligne nu au mobilitate superioară.

Celulele transformate malign pierd *fibronectina*, ceea ce explică scăderea aderenței de suport şi creşterea mobilității. Pierderea fibronectinei este consecința ratei scăzute de sinteză, a secreției proteazelor, a turnover-ului ridicat sau a exprimării diminuate a receptorilor de fibronectină pe suprafața celulei. Adăugarea fibronectinei (*in vitro*), derivată din celulele normale, reversează la normalitate morfologia celulelor tumorale.

Pe suprafața celulelor maligne se găseşte o cantitate crescută de *mucopolizaharide*, ce se evidențiază cu colorații speciale.

Celula tumorală conține pe suprafața sa, molecule glicoproteice noi (absente pe suprafața celulei normale), care se comportă ca *antigene*. Sinteza lor este determinată de starea transformată. Antigenele tumorale formează o adevărată rețea moleculară pericelulară.

3) *Schimbările componentelor intracelulare* includ, în primul rând, *modificările citoscheletului.* Independența de creștere față de suportul mecanic se corelează cu modificări ale citoscheletului: pierderea filamentelor de actină sau redistribuirea lor în celulă. În celula normală, filamentele de actină se inseră pe membrana plasmatică, la joncțiunea acesteia cu suportul de creștere. În celula malignă, *filamentele de actină au o distribuție difuză.* Datorită dezorganizării rețelei de actină, celulele maligne sunt mai ușor deformabile. De aceea, la examenul microscopic, morfologia celulelor tumorale este modificată. Pierderea elementelor de citoschelet se asociază cu creșterea mobilității proteinelor suprafeței celulare.

4) *Modificări fiziologice.* In celulele transformate malign, activarea sau supresia unor gene celulare specifice sunt modificări obișnuite, datorate proceselor de *dediferențiere celulară*, ce constau în pierderea într-o măsură mai mare sau mai mică, a funcțiilor specifice celulelor normale de origine.

Celulele maligne sunt *anaplazice,* adică dediferențiate și au caractere structurale și fiziologice apropiate de acelea ale celulei *stem.* Probabil că anaplazia malignă este rezultatul blocării diferențierii celulelor derivate din celulele stem. Celulele tumorilor benigne se aseamănă cu cele normale. În unele cazuri, celulele transformate malign prezintă activități de tipul "uzurpărilor de identitate". De exemplu, tumorile de origine pulmonară produc hormoni hipotalamici (vasopresina) sau hipofizari (hormon corticotrop), fapt explicabil prin derepresia unor gene nefuncționale în celula normală de origine.

Sinteza factorilor de creștere. Factorii de creștere sunt proteine secretate de celulele normale, cu efect stimulator al creșterii celulelor embrionare și diferențiate.

Unele celule transformate produc atât factori de creștere, cât și receptorii corespunzători, ceea ce constituie o modalitate de autostimulare a creșterii, denumită *stimulare autocrină.*

Secreția proteazelor. Celula transformată secretă proteaze, care ușurează procesul de metastazare. Este cunoscută proteaza activatoare a *plasminogenului*, ce clivează o legătură peptidică a plasminogenului seric și-l convertește la *plasmină*, o protează. Secreția unei mici cantități de activator al plasminogenului, determină creșterea concentrației plasminei în plasmă. Celulele normale tratate cu protează, manifestă unele caracteristici ale celulelor transformate (pierderea microfilamentelor de actină, stimularea creșterii), ceea ce sugerează că secreția de activator al plasminogenului favorizează menținerea stării transformate a anumitor linii celulare. *In vivo*, proteaza favorizează metastazarea celulelor maligne prin membrana bazală.

Creșterea ratei sintezei macromoleculelor (ADN, ARN, proteine). În celula malignă, sinteza ADN are loc cu o rată net superioară (de până la 10 ori mai mare), în raport cu celula normală.

Creșterea ratei metabolice. Deoarece mecanismele de transport membranar sunt foarte eficiente, celula tumorală se comportă ca o *capcană de substanțe nutritive.* Transportorul de glucoză are afinitate mult mai mare pentru glucoză, decât cel neuronal sau eritrocitar. Transportul glucozei cu o rată crescută se corelează cu glicoliza înaltă a celulelor maligne.

Celulele tumorale manifestă *efectul Crabtree* – fenomenul de inhibiție a respirației în prezența glucozei. Consecința este că celulele tumorale catabolizează glucoza pe cale predominant *anaerobă* (fermentativă) și produc cantități mari de acid lactic. Catena de respirație celulară, pierde într-o măsură semnificativă, citocromii *a, b* și *c*, prin diminuarea sintezei lor. Astfel, activitatea ciclului Krebs scade până la inhibiția totală.

Rata de creștere și diviziune a celulelor maligne este net superioară față de a celulelor normale de origine, ca o expresie a ratei metabolice foarte înalte.

5) *Modificări genetice.* Informația genetică transformantă (oncogena celulară malignizantă, ADN viral) și produsele de transcriere și traducere (ARNm viral, proteinele virale) sunt prezente constant în celulele transformate de virusuri.

Celulele maligne se caracterizează prin modificări genetice, ce se manifestă printr-o accentuată instabilitate a setului cromosomal. Sunt frecvente modificările numerice ale garniturii cromosomale (aneuploidie). Schimburile intercromosomale de fragmente sunt un marker distinctiv al celulelor maligne. Una dintre modificări este *translocația*, fenomen mutațional prin care un fragment cromosomal de dimensiuni variate este transferat de pe un cromosom, pe altul neomolog. De exemplu, în leucemia mieloidă cronică, un fragment al unui cromosom al perechii 22 este translocat pe un cromosom al perechii 9. Cromosomul mai scurt al perechii 22 se numește *cromosom Philadelphia* și este rezultatul unui proces de translocație nereciprocă. In celulele tumorale au loc, uneori, procese de translocație robertsoniană, prin care cei doi cromosomi telocentrici, fuzionează prin centromerii lor, rezultând un cromosom metacentric sau submetacentric.

23.5. Oncogenele celulare

Denumirea de "oncogene" semnifică faptul că sunt gene care au potențialul de a determina transformarea malignă a celulei, sub acțiunea inductoare a unor factori de mediu, fiind astfel implicate în dezvoltarea neoplaziilor. Transformarea malignă indusă de virusurile oncogene ARN şi ADN presupune interacțiunea genomului viral cu oncogenele.

Oncogenele* sunt componente ale *setului normal* de gene celulare şi se numesc *oncogene celulare (c-onc)* sau *protooncogene*. Disfuncția lor produce transformarea malignă. Unele (ras, jun) au o constanță evolutivă remarcabilă, fiind prezente de la levuri până la om.

* Oncogenele celulare s-au descoperit în studiile cu retravirusurile care determină transformarea rapidă a celulelor *in vitro*. Celulele normale conțin copii foarte înrudite cu gene transformante retravirale. Secvențele celulare s-au izolat şi s-au încorporat în genomul retraviral. Alte oncogene celulare au fost detectate cu metode moleculare.

Oncogenele celulare codifică sinteza *oncoproteinelor*, localizate în toate compartimentele celulei: membrană, citoplasmă şi nucleu. In condiții normale, oncogenele şi oncoproteinele îndeplinesc funcții esențiale pentru controlul *creşterii, diviziunii* şi *diferențierii celulelor* în *cursul dezvoltării embrionare*. Protooncogenele sunt foarte bine conservate în evoluție şi expresia lor este controlată prin mecanisme multiple. Oncoproteinele controlează proliferarea normală, diferențierea şi apoptoza. În condiții de dezechilibru funcțional (mutație, translocație cromosomală, amplificare genică sau inserția unui promotor), oncogenele şi oncoproteinele sunt efectorii transformării maligne.

Creşterea normală şi malignitatea sunt cele două variante funcționale ale celulelor.

Creşterea celulară normală este controlată de 5 tipuri de proteine, codificate de oncogene:

- factori de creştere (de exemplu, gena *sis* codifică lanțul β al PDGF);
- receptori de factori de creştere cu acțiune tirozin-kinazică: erbB (codifică EGFR), fms (codifică CSF-1 R). Pentru unele proteine membranare cu rol de receptor, ligandul nu este cunoscut;
- transductori intracelulari ai semnalului: acestea sunt poteine membranare din familia Ras care leagă guanina, au activitate GTP-azică şi au rol de transductori ai semnalelor eliberate de receptorii factorilor de creştere (tirozin-kinaze, de exemplu, *src*);
- factori nucleari ai reglării transcrierii (de exemplu, *myc, myb, fos, jun, erbA* şi *rel*);
- proteine care controlează ciclul celular (cicline).

Factorii de creştere, ca şi hormonii, nu au efecte metabolice, dar au rolul de semnale, fiind liganzi pentru receptorii specifici şi induc răspunsuri multiple (diferențierea, intrarea în ciclul mitotic). Evenimentele celulare încep cu interacțiunea ligand-receptor, fie la suprafața celulei, fie în interiorul ei.

Oncoproteinele din membrana citoplasmatică sunt *integrine*, adică molecule care mediază integrarea celulei în ansamblul tisular şi au rol de *receptori* ai semnalelor din mediu (fig. 444). Cei mai cunoscuți receptori intra-celulari sunt cei pentru *steroizi*.

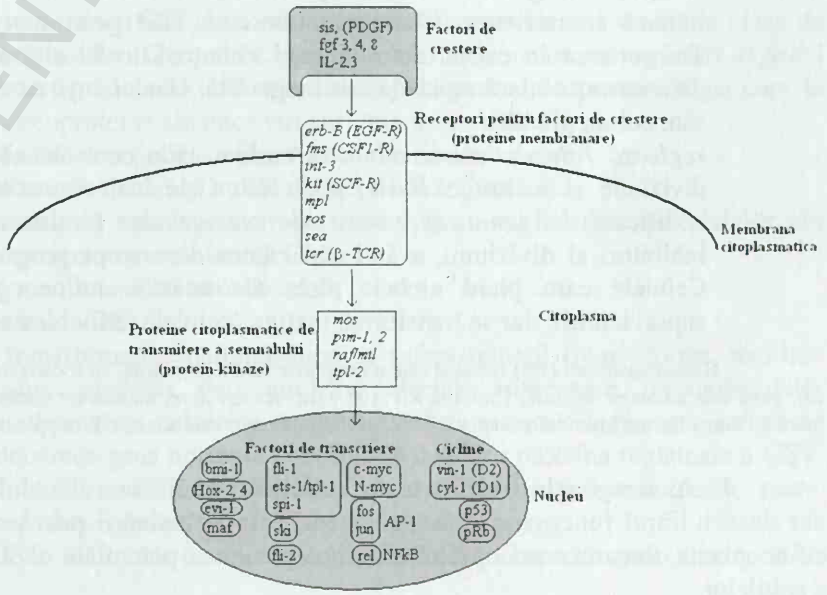


Fig. 444. Oncoproteinele sunt localizate în toate compartimentele celulei, fiind componente ale catenelor care controlează creşterea şi diviziunea.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Celula normală se caracterizează prin capacitatea de a recepționa și de a răspunde adecvat semnalelor pe care le primește din mediul extracelular. *Semnalul* stimulator al creșterii ajunge la suprafața celulei sub forma unui *factor polipeptidic*, care se leagă cu *receptorul* membranar. Adeseori, receptorul celular este o proteină membranară integrată, cu activitate specfică, tirozin-kinazică.

Mecanismul general de acțiune a oncoproteinelor membranare este următorul: după ce au legat o moleculă semnal din exterior, oncoproteinele dobândesc proprietăți *fosfokinazice*. Molecula receptor se dimerizează, activitatea ei kinazică crește și resturile de *tirozină* din secvența citoplasmatică se *autofosforilează*. Semnalul recepționat este transmis prin fosforilarea unei catene de proteine citoplasmatice, până în nucleu. Receptorul final al semnalului este un factor activator al transcrierii, ce controlează un set de gene.

* Celulele își reglează activitatea prin fosforilarea enzimelor și a altor enzime. Fosforilarea are avantajul că este rapidă, nu necesită sinteză sau degradare proteică pentru a schimba activitatea metabolică a celulei. Efectul este reversat sub acțiunea protein-fosfatazelor, care scot grupul fosfat. Multe enzime se activează prin fosforilare și se inactivează prin defosforilare. Proteinele pot fi fosforilate la tirozină, serină sau treonină sau la histidină. Fiecare dintre acestea necesită o clasă de kinaze.

Oncoproteinele citoplasmatice sunt componente ale *catenei de propagare* a semnalului recepționat la suprafața celulei și constituie cel mai numeros grup. Cei mai cunoscuți transductori sunt *proteinele G**, iar una dintre ele (G_S), activată de un receptor de suprafață, leagă GTP și activează adenil-ciclaza, ce sintetizează AMPc.

* Proteinele G se numesc astfel deoarece leagă GTP. Un grup de gene implicate în transducerea semnalului intracelular aparțin familiei *Ras*. Gena *Ras* (rat sarcoma) suferă frecvent mutații în tumorile induse chimic la animale și au cea mai înaltă rată a mutației (20-30%), în tumorile umane colorectale, pancreatice sau tegumentare. Familia *Ras* cuprinde variantele H-ras (*H*arvey), K-ras (*K*irsten) și N-ras (*N*euronală), toate fiind activate mutațional în numeroase tipuri de tumori induse de factori fizici și chimici. Fiecare genă Ras codifică o proteină de 21 kDa, cu rol în transducerea semnalului celular.

Alte proteine din aceiași clasă (*Src, Abl*) sunt *protein- tirozin-kinazice* (PTK).

Oncoproteinele nucleare sunt componentele terminale ale catenei proteice și îndeplinesc următoarele funcții:

- *reglează sinteza ADN;*
- *reglează proporția transcrierii diferitelor molecule de ARNm*, pentru că celulele care cresc sintetizează proteine cu rate mai mari față de celulele în repaus. Transcrierea este controlată prin două tipuri de secvențe de ADN: *promotori* (localizați la punctul de start al transcrierii) și *secvențe stimulatoare* (enhancer), situate mai departe de situsul de start. Controlul transcrierii este exercitat de proteine specifice, denumite *factori nucleari de transcriere.* Aceștia se leagă de secvențele specifice și accelerează sau întârzie rata cu care ARN-pol II inițiază transcrierea. Cea mai cunoscută este gena *c-myc*, stimulatoare a proliferării. Transcrierea în exces, datorită unei mutații sau datorită amplificării genice, favorizează diviziunea celulară rapidă și carcinogeneza. Gena c myc este amplificată în carcinoamele de sân, colon, plămân;
- *reglează rata diviziunii celulare (cicline).* Ele controlează intrarea celulelor în ciclul de diviziune și includ *ciclinele, p53, RB.* Cele mai cunoscute sunt proteinele RB și p53, codificate de *gene supresoare ale oncogenelor* (antioncogene). Ambele acționează ca inhibitori ai diviziunii, având capacitatea de a stopa progresia celulelor spre malignizare. Celulele care pierd ambele alele ale acestor antioncogene au avantajul selectiv al supraviețuirii, dar se transformă malign (celulele retinoblastomului*).

* Retinoblastomul (Rb) familial este o neoplazie rară a copilăriei, cu localizare într-un ochi sau în ambii. In tumorile Rb, gena este adeseori deletată. Proteina Rb (105 kDa) are un nivel maxim de fosforilare în timpul fazei S și minim după mitoză. Numai forma hipofosforilată a RB are activitate de supresie a creșterii neoplazice.

Protooncogenele exprimate în condițiile unui control celular normal nu sunt oncogene, dar dezechilibrul funcțional al acestor gene datorat activării prin procese mutaționale este asociat cu neoplazia, deoarece oncoproteinele au capacitatea potențială de a induce transformarea malignă a celulelor.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

S-au identificat peste 100 de oncogene, dintre care circa 30 au rol major în neoplaziile umane.

Genele *c-onc*, foarte active în timpul dezvoltării embrionare, esențiale pentru diferențierea celulară, ulterior se *represează*, unele complet, iar altele sunt transcrise cu o rată foarte scăzută. Toate oncogenele își păstrează capacitatea de a-și *relua activitatea* și respectiv, de a și-o intensifica în diferite condiții:

– după infecția cu un virus oncogen;
– sub acțiunea unor factori de mediu (substanțe cancerigene, radiații UV sau ionizante);
– după mutații punctiforme care determină creșterea ratei de transcriere.

Toți acești factori activează potențialul transformant al oncogenelor.

Oncogenele celulare (protooncogene) s-au izolat din țesuturile normale, iar corespondentele lor malignizante, s-au izolat de la retravirusuri și din țesuturi maligne umane.

Cea mai cunoscută *oncogenă celulară* (protooncogenă) este *c-src*, omologă cu gena *v-src* a virusului sarcomului Rous. Gena *c-src* se găsește la păsări, pești, mamifere, om și este esențială pentru celulă. Ea codifică sinteza unei tirozin-kinaze (enzima care fosforilează proteinele la nivelul resturilor de tirozină).

Oncogenele din celulele normale au corespondent în celulele maligne. Uneori, cele două gene sunt identice, iar alteori se deosebesc printr-o singură pereche de baze, oncogena malignizantă fiind o *mutantă punctiformă* a genei normale. Substituția unui singur aminoacid în proteina codificată, poate converti o protooncogenă într-o oncogenă.

Conversia unei protooncogene în oncogenă se face prin mecanisme multiple, dar toate implică modificări genetice:

– schimbarea unei singure baze prin *mutație punctiformă*, determină apariția unei variante genice noi. Gena poate fi supraexprimată și proteina codificată se sintetizează în *exces*, modificând rata creșterii celulare;
– oncoproteina codificată de *gena mutantă*, poate fi o moleculă mai stabilă și astfel activitatea ei biologică va crește;
– *translocația* într-o nouă localizare și trecerea unei gene sub controlul unui alt promotor, sau separarea de un element reglator adiacent, poate altera expresia protooncogenelor. O protooncogenă poate să devină oncogenă, când intră sub acțiunea reglatoare a *promotorului viral*, care poate avea o activitate semnificativ superioară promotorului normal. După inserția ADN viral într-un cromosom al celulei, oncogena poate fi exprimată la o rată mai înaltă decât protooncogena;
– gena este exprimată într-un moment nepotrivit al ciclului celular sau într-un țesut neadecvat.

Activarea oncogenelor sau inactivarea antioncogenelor este numitorul comun al tuturor tipurilor de neoplazii.

Genele supresoare ale tumorilor (GST) sau *antioncogenele* constituie cea de a II-a clasă de gene implicate în dezvoltarea neoplaziilor. Ele codifică proteine ce funcționează ca *reglatori negativi* ai creșterii sau ca reglatori ai morții celulare. GST s-au identificat pentru că proteinele pe care le codifică formează complexe cu oncoproteine ale unor virusuri tumorale ADN.

Genele supresoare ale tumorilor acționează prin mai multe mecanisme:

– codifică proteine localizate în nucleu și au rol de factori de transcriere;
– codifică proteine localizate în membrana citoplasmatică și au rol în aderența celulelor sau sunt componente ale matricei extracelulare (ECM);
– mediază interacțiunile membranei cu citoscheletul;
– sunt implicate în repararea ADN.

GST sunt implicate în transformarea malignă după ce suferă mutații (punctiforme, metilare punctiformă, deleție parțială sau completă), care anulează efectele supresoare ale moleculelor codificate. Datorită caracterului diploid al celulelor, mutația unei singure GST nu este suficientă pentru transformarea malignă, deoarece gena normală continuă să codifice proteina reglatoare a GST. Dacă este inactivată și a II-a copie a GST, predispoziția la apariția tumorii este foarte mare. Fenomenul se numește pierderea *heterozigoției* (LOH = *L*ost *o*f *h*eterozygosity).

Se cunosc circa 18 GST: *p53, Rb* (retinoblastoma), *BRCA1* (breast cancer), *p16, APC* (adenomatous polyposis coli).

Prototipul GST este *rb*. Proteina *Rb* (105-110 kDa) este localizată în nucleu şi reglează ciclul celular: formează complexe cu factorii reglatori ai transcrierii din familia E_2F şi inhibă intrarea celulei în faza S. Funcţia proteinei normale Rb este reglată prin fosforilare. Pierderea funcţiei ambelor gene Rb predispune la apariţia retinoblastomului, o tumoră retiniană rară la copiii foarte mici (40% sunt cazuri familiale, 60% sunt cazuri sporadice).

p53 s-a descoperit sub forma unui complex cu antigenul T de SV_{40}. p53 are localizare nucleară şi controlează proliferarea celulelor şi supresează tumorigeneza. Este un factor de transcriere cu rol reglator al progresiei ciclului celular şi al morţii celulare şi este considerată un 'paznic al genomului'.

După lezarea ADN, p53 este activată prin fosforilare, de acţiunea enzimelor de reparare a ADN. Rolul ei este de a stopa desfăşurarea ciclului în celulele al căror ADN este lezat, astfel încât enzimele de reparare au şansa să repare eroarea sau, dacă eroarea nu poate fi reparată, p53 determină *intrarea celulei în apoptoză*. In absenţa p53, celulele care au suferit mutaţii, pot supravieţui şi creşterea lor favorizează acumularea altor mutaţii ce nu pot fi reparate. Astfel creşte riscul formării tumorii.

p53 este mutantă în peste 50% dintre neoplaziile umane. În unele celule tumorale, mutaţia se detectează într-o singură alelă a p53. Heterozigoţia genei p53 predispune la neoplazie, datorită structurii homotetramere a proteinei p53. Intr-o celulă în care o genă este normală şi cealaltă este mutantă, se poate forma un homotetramer în care 3 catene sunt normale, iar cea de a IV are conformaţie alterată şi tetramerul este nefuncţional. Mai mult, tetramerul proteinelor mutante sechestrează catenele normale şi şansa formării proteinei funcţionale scade.

În evoluţie, oncogenele nu s-au diversificat pentru a produce neoplazii, şi nici TSG pentru a represa neoplaziile: oncogenele sunt funcţionale în timpul proliferării rapide, când ţesuturile embrionare cresc rapid şi se diferenţiază, iar TSG sunt gene care stopează diviziunea celulară şi permit diferenţierea. Din acest punct de vedere, transformarea malignă este consecinţa unei diferenţieri incomplete sau eronate, ulterior asociată cu proliferarea necontrolată.

Bibliografie

Razin A., Cedar H. 1991. DNA methylation and gene expression. Microbiol. Rev. 55 (3): 451–458.
Freifelder D. 1987. Tumor Viruses and Oncogenes în vol. Molecular Biology, Sec. Edition.
McLeod G. R. 1993. Ultraviolet Light and Skin Cancer. Karger Gazette, no. 56.
Mişcalencu D. 2002. Cancerizarea chimică, Ed. Universităţii Bucureşti.

23.6. Oncogeneza virală

Convenţional, *virusurile oncogene* (tumorigene) sunt acelea care produc neoplazii prin conversia malignă a celulelor infectate. Pentru unele virusuri, potenţialul transformant a fost demonstrat numai pentru celulele *in vitro*.

Ipoteza originii virale (infecţioase) a neoplaziilor este veche. În 1903, Metchnikoff şi Borell au presupus ca tumorile maligne s-ar putea datora infecţiei cu agenţi patogeni. În 1908, Ellerman şi Bang au arătat că leucoza găinilor poate fi transmisă de la organismele bolnave, la cele sănătoase, prin filtratul acelular al sângelui. În 1911, P. Rous a izolat virusul dintr-un sarcom pectoral spontan al puilor de găină şi a adus dovada experimentală, că sarcomul (o tumoră solidă) este produs de un agent filtrant. Descoperirea sa a fost prea timpurie faţă de nivelul general al cunoaşterii şi nu s-a impus atenţiei. Cercetările au fost abandonate, dar pentru valoarea deosebită a rezultatelor investigaţiilor, lui P. Rous i s-a decernat, postmortem, premiul Nobel (1966).

Unul dintre factorii majori ai neîncrederii în originea posibil infecţioasă a neoplaziei provenea din faptul că tumorile nu se transmit de la organismul bolnav la cel sănătos. Tumorile organismelor animale şi umane nu sunt infecţioase în crescătorii sau în spitale. Observaţiile clinice sugerau că tumorile apar din alte cauze decât cele infecţioase, rolul factorilor chimici fiind preponderent:

– la şoarece, badijonarea regională a tegumentului cu gudroane, provoacă o iritare cronică şi apariţia, în timp, a tumorilor maligne;

– existenţa neoplaziilor profesionale: tumori tegumentare la personalul unităţilor radioactive, expus iradierilor accidentale, neoplazia scrotală la coşari;

– cancerul pulmonar la fumători (componetele cancerigene sunt gudroanele rezultate din arderea tutunului şi a foiţei). În zonele geografice unde tutunul se mestecă, tumorile sunt localizate pe limbă sau pe mucoasa bucală.

Problema originii infecţioase a unor tumori a fost reluată de către L. Gross (1952), care a descoperit virusul leucemiei şoarecelui. S-a considerat că şoarecele este un organism oarecum "artificial", datorită gradului înalt de consanguinizare. În 1964 s-a evidenţiat cu certitudine, natura virală a unei tumori umane: virusul Epstein-Barr este agentul declanşator al proliferării celulare ce produce *limfomul Burkitt* (o tumoră a regiunii maxilare, la copiii între 4 şi 15 ani), cu originea în limfocitele B.

Cercetările ulterioare, pe sisteme celulare *in vitro,* au scos în evidenţă că un număr mare de virusuri, în special cu genom ADN au capacitatea de a induce transformarea malignă a celulelor.

În regnul vegetal există o dovadă certă a originii infecţioase a proliferării celulare necontrolate: tumorile de colet (crown gall) sunt produse de *Agrobacterium tumefaciens*, o bacterie heterotrofă din sol. Proliferarea celulară necontrolată este rezultatul transferului plasmidei *Ti* (*T*umor *i*nducing), în celulele plantei.

Virusurile produc 15–20% din totalul neoplaziilor umane. Din cele peste 600 de virusuri, infecţioase pentru om şi animale, circa 150 sunt considerate *potenţial oncogene* şi sunt distribuite în următoarele grupe:

– *Oncornavirusuri*, virusuri oncogene cu genom ARN din familia *Retraviridae*;

– *Oncodnavirusuri*, virusuri oncogene cu genom ADN, care aparţin câtorva familii.

Familia *Papovaviridae*, cu subfamiliile *Papillomavirinae* (g. *Papillomavirus*) şi *Polyomavirinae* (g. *Polyomavirus),* virusurile vacuolante *(SV_{40})*. Papilomavirusurile determină apariţia papiloamelor la numeroase specii: om, feline, bovine, iepure. Papiloamele au o evoluţie benignă, dar uneori pot progresa la un carcinom metastazant. Virusul polioma induce tumori la şoarece. SV_{40}, în condiţii naturale, infectează maimuţele (*M. rhesus, Cercopithecus, Cynomolgus*). Tumorile produse de *Polyoma* şi de virusurile vacuolante la puii de rozătoare sunt delimitate de o capsulă bine diferenţiată, necrozează extensiv în zona centrală şi nu metastazează.

Familia *Adenoviridae*. Opt din cele aproape 50 de serotipuri care infectează omul, produc sarcoame la hamsterul nou născut. Cele mai oncogene sunt serotipurile 12, 18 şi 31, iar serotipurile 3, 7, 14, 16 şi 21 au activitate oncogenă slabă. Potenţialul oncogen s-a evidenţiat la 6 serotipuri infecţioase pentru maimuţă, precum şi la altele izolate de la bovine şi câine.

Familia *Herpesviridae*. La om *virusul Epstein-Barr* este agentul inductor al limfomului Burkitt. *Virusul Lucke* produce adenoame şi adenocarcinoame ale rinichiului broaştei leopard. La păsări, *virusul Marek* produce o neurofibromatoză, caracterizată prin proliferarea invazivă a limfocitelor T.

Familia *Hepadnaviridae. Hepadnavirus* (virusul hepatitei B) produce carcinomul hepatocelular.

Familia *Poxviridae*. Unele poxvirusuri induc răspunsuri hiperplazice şi chiar tumori în tegumentul animalelor infectate: *virusului fibromului Shope, Yaba virus, Moluscipoxvirus*. În unele cazuri s-a observat stimularea replicării ADN şi pierderea inhibiţiei de contact. ADN viral nu se integrează în genomul celular.

Virusurile oncogene sunt potenţial transformante *in vivo*, dar unele transformă numai celulele *in vitro*.

Alte virusuri, (HIV) favorizează indirect dezvoltarea şi creşterea tumorilor, de exemplu, prin blocarea răspunsului imun antitumoral.

Modificările de natură malignă a celulelor, *in vitro,* apar la 12–48 de ore după infecţie.

Pentru ca un virus sa fie oncogen trebuie să îndeplinească următoarele condiţii:

– informaţia genetică virală *să se replice în nucleul celulei* şi să aibă capacitatea de a se integra în ADN celular, ceea ce permite genomului viral să persiste în genomul celulei şi să se transmită generaţiilor succesive de celule;

– să conţină *informaţie genetică transformantă*, care să inducă trecerea celulei de la starea normală la cea malignă, sau dacă nu conţine gene transformante, *să interfere* cu activitatea *oncogenelor celulare*.

Transformarea malignă este rezultatul acțiunii genelor *oncogene ale virusurilor cu genom ADN*, a *oncogenelor virusurilor cu genom ARN*, a *oncogenelor celulare* (protooncogene) și a *genelor supresoare* ale oncogenelor celulare denumite *antioncogene*. Antioncogenele codifică proteine care inhibă creșterea și multiplicarea celulară.

Pentru a-și exercita efectul transformant, virusurile oncogene acționează sinergic cu alți factori de mediu sau genetici, denumiți factori *co-carcinogeni*.

Trăsăturile generale ale transformării maligne sub acțiunea virusurilor oncogene sunt următoarele:

a) Teoretic, transformarea este rezultatul infecției celulei cu o singură particulă virală;

b) Transformarea este însoțită de persistența întregului genom viral sau numai a unei părți a acestuia, integrate în ADN celular. Fenotipul celulei transformate poate fi reversat la cel normal, prin interferența specifică cu funcțiile moleculelor virale efectoare.

c) Transformarea este însoțită de exprimarea continuă a unui număr limitat de gene virale. Uneori, o singură genă virală este suficientă pentru a menține starea transformată.

d) Tumorile induse de virusuri conțin copii ale genomului viral sau o parte a genomului, de cele mai multe ori integrat în genomul celulei.

Studiul transformării maligne sub acțiunea virusurilor este important pentru descoperirea etiologiei virale a unor neoplazii, precum și pentru evidențierea protooncogenelor activate în neoplazii de etiologie nevirală.

23.6. Retravirusuri oncogene transductoare și netransductoare

Retravirusurile oncogene sunt grupate în subfamilia *Oncovirinae*. Interacțiunea lor cu *oncogenele celulare* a furnizat singura cale de acces pentru studiul acestor gene.

În raport cu capacitatea lor de a încorpora oncogene celulare în genom, retravirusurile oncogene aparțin următoarelor două grupe:

– *transductoare*, sunt acelea care poartă oncogene celulare în genomul lor;

– *netransductoare*, caracterizate prin absența oncogenelor celulare în structura lor genomică.

23.6.1. Oncogenele virusurilor transductoare

Retravirusurile sunt singurele printre virusurile infecțioase pentru animale, care au capacitatea de a încorpora fragmente ale unor gene celulare (c-onc = protooncogene) în genomul lor și de a altera structura și expresia lor fenotipică, astfel încât ele transformă celula normală în una malignă.

Retravirusurile transductoare poartă în genomul lor gene oncogene (*v-onc*), foarte asemănătoare, până la identitate, cu genele *c-onc* (tabelul 69). Asemănarea celor două categorii de gene a fost evidențiată prin analiza *secvenței de baze* și prin tehnicile de *hibridare moleculară in situ*.

Toate oncogenele retravirale sunt derivate din genomul gazdei și reprezintă o achiziție recentă.

Cele mai productive surse de oncogene virale au fost animalele, la care infecția cu virusurile leucemice este comună: puiul de găină, pisicile de casă care fac frecvent tumori.

Denumirile protooncogenelor sunt prescurtări sau acronime pentru virusurile sau țesuturile de origine. Aceste gene codifică sinteza unor *tirozin-kinaze* (src), *treonin-kinaze*, a unor proteine care se asociază cu ADN și au rol în reglarea replicării sau a unor proteine reglatoare ale creșterii și diviziunii celulare, asemănătoare ca acțiune, factorilor de creștere.

Genele v-src și c-src au fost primele, oncogenă, respectiv protooncogenă, identificate. Gena v-src este gena transformantă a VSR ce produce transformarea neoplazică a mușchiului pectoral al puiului de găină. V-src codifică o fosfoproteină ($p60^{v\text{-}src}$), o tirozin-kinază. C-src este omologul celular al v-src în celulele normale de pui de găină. Studiile de hibridare moleculară *in situ* au argumentat că gena *v-src* a virusului sarcomului Rous (VSR) este de origine celulară.

Concluzia este că v-src a derivat din ARNm înnădit al genei c-src: gena *v-src* a fost încorporată de virus sub forma ARN din celula gazdă și astfel virusul a dobândit proprietăți oncogene.

BCU "IOAN CREANGĂ" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 69.

Sursa şi denumirile celor mai reprezentative *oncogene retravirale*.

Oncogena celulară	*Virusul transductor*	*Sursa de celule maligne*
Abl	Virusul leucemiei murine Abelson (MuLV)	Limfomul celulelor B de şoarece şi om
Erb A, erb B – tirozin- kinază cu rol de receptor pentru EGF.	Virusul eritroblastozei aviare (VEA).	Fibrosarcom şi leucemie de pui de găină.
Fes, fgr, fms	Virusul sarcomului felin	Fibrosarcom felin
Fos	Virusul osteosarcomului murin (FBJ MuSV)	Condrosarcomul de şoarece
Fps	Virusul sarcomului Fujinami (FuSV)	Sarcom de pui de găină
H-ras, N-Ras, K-Ras codifică proteine din familia G (cele care leagă GTP şi îl hidrolizează la GDP). Au rol în transducerea semnalului factorilor de creştere.	Virusul sarcomului murin Harvey, respectiv virusul sarcomului Kirsten.	Sarcom de şobolan, carcinom uman şi de şobolan.
Hst, Int -2 - factori de creştere ai fibroblastelor	–	Carcinom gastric, respectiv de sân
Myb, myc – factori de transcriere ce conţin un domeniu N-terminal de legare la ADN. Proteinele c-Myb şi v-Myb se leagă la ADN şi transactivează genele ce leagă Myb la promotorul lor. Expresia *c-myc* este esenţială pentru progresia ciclului celular şi pentru diferenţiere. Scăderea expresiei c-myc în celulele hematopoetice se corelează cu diferenţierea terminală, iar expresia constitutivă duce la blocarea procesului de diferenţiere.	Virusul mieloblastozei aviare (AEV)	Celule leucemice de pui de găină şi celule leucemice umane
Rel	Virusul reticuloendoteliozei	Leucemie limfoidă de curcan
Sis – factor de creştere derivat din plachete.	Virusul sarcomului simian (VSS)	Sarcom de maimuţă
Src – o tirozin kinază non – receptor.	Virusul sarcomului Rous	Sarcom de pui de găină
Jun – factor de transcriere		Osteosarcom, carcinom tegumentar
PKC– serin-treonin kinază		Carcinom tegumentar
Raf – serin- treonin kinază		Carcinom hepatic, pulmonar
Bcl-2 – factor antiapoptotic		Limfoame.

Ipoteza originii celulare a *v-src* este sprijinită de faptul că mutantele virale rezultate prin deleţia genei *src,* se multiplică normal. Rezultatele se pot extrapola pentru toate oncogenele *transduse* de retravirusuri.

Comparaţia v-ras şi c-ras relevă că oncogenele virale conţin două mutaţii punctiforme care îi modifică activitatea GTP-azică şi o fac insensibilă la reglarea negativă.

Genele retravirale oncogene *nu conţin introni*, în timp ce oncogenele celulare sunt totdeauna discontinui. Există şi alte gene care şi-au pierdut intronii, dar nu se cunoaşte nici una care să-i fi dobândit.

Virusurile transductoare au o eficienţă foarte mare de transformare a celulelor *in vitro* (24–48 de ore) iar *in vivo* produc tumori la *câteva zile* după inoculare. Este o *transformare acută*, iar tumorile sunt *policlonale* (de exemplu, mielo-monocitoza indusă la pui de virusul leucemiei aviare, MC29).

Virionul are rolul unui *vehicul transductor* pentru oncogenele de origine celulară. După ce au fost transduse într-o nouă celulă, transcrierea lor este controlată de genomul viral.

Mecanismul transducţiei oncogenelor celulare este ipotetic. Se admite că integrarea genomului viral ca provirus are loc în proximitatea unei *oncogene celulare*, în amonte, în raport cu promotorul ei, în aceiaşi orientare de transcriere. Transcrierea genomului viral, catalizată de aparatul enzimatic al celulei, se extinde asupra oncogenei celulare, deoarece gena *c-onc* trece sub controlul promotorului viral. Astfel, este transcrisă o moleculă *himeră* de *ARN, care conţine atât copia provirusului cât şi a oncogenei celulare*. Copia de ARN este prelucrată prin mecanismul clivării şi înnădirii (intronii sunt excizaţi) şi *ARN himeric* va forma genomul virionilor progeni.

O altă ipoteză presupune că încorporarea genei *c-onc* este rezultatul unui eveniment *postînnădire* al copiei de ARN celular, în etapa transcrierii inverse printr-un mecanism de alegerea matriţei.

Informaţia *onc* transdusă înlocuieşte o parte a informaţiei genetice virale. Ca urmare, virusurile transductoare sunt *defective ale ciclului de multiplicare*, deoarece în capsidă poate fi împachetată o cantitate limitată de ARN genomic, iar oncogena celulară a înlocuit total sau parţial o secvenţă esenţială pentru multiplicare.

Retravirusurile defective codifică majoritatea etapelor ciclului de multiplicare: revers-transcrierea, integrarea, sinteza ARN şi traducerea. Ele produc transformarea malignă a celulelor pe care le infectează, dar nu se asamblează virus progen, deoarece nu se sintetizează proteine structurale. Virionii progeni se asamblează numai dacă aceiaşi celulă este infectată de un retravirus cu ciclu complet de multiplicare, care suplineşte deficienţele virusului defectiv.

VSR, transductor al genei *v-src*, este o excepţie. Ea se adaugă întregului set de gene virale şi virionii transductori nu sunt defectivi pentru ciclul de multiplicare. Deleţia genei *v-src* nu influenţează capacitatea de multiplicare a VSR.

Fenomenul transducţiei este un eveniment rar. Virusurile transductoare nu pot fi considerate ca agenţi infecţioşi naturali, ci ca accidente ale ciclului de multiplicare, deoarece virionii transductori sunt defectivi.

Oncogenele de origine celulară sunt transduse sub forma unei copii de ARN. Un virus transduce *o singură genă*, rareori două. Genele *onc* transduse de retravirusuri sunt cei mai eficienți agenți ai transformării maligne (fig. 445, 446).

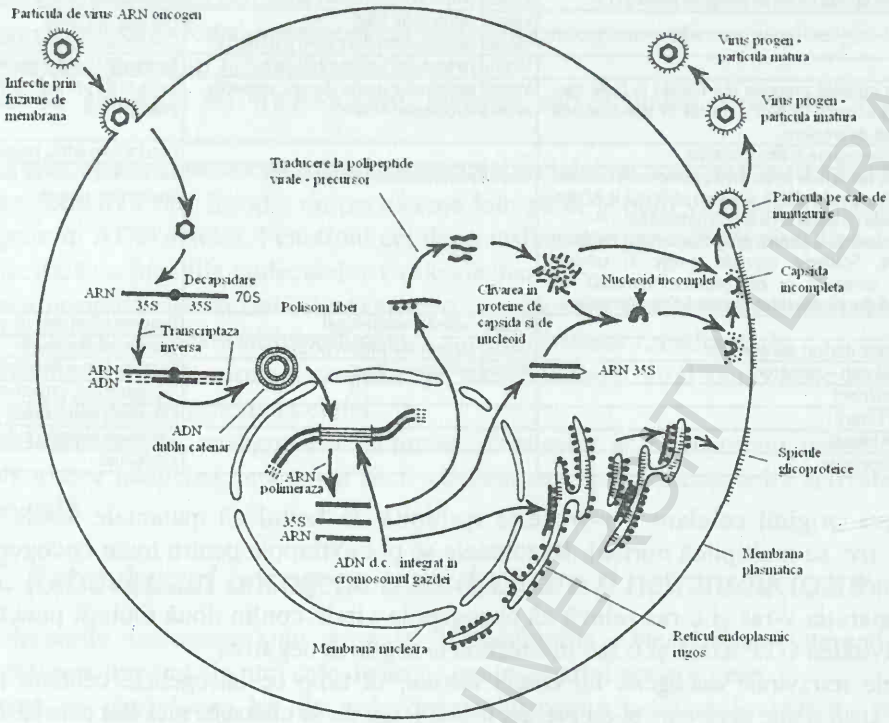


Fig. 445. Reprezentarea schematică a principalelor etape ale ciclului de multi-plicare a virusurilor tumorale ARN.

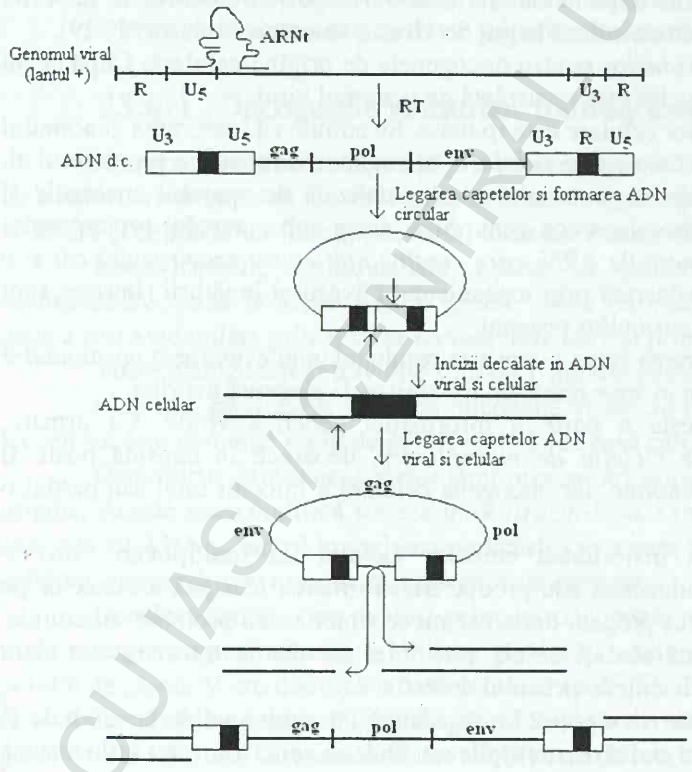


Fig. 446. Ilustrarea schematică a mecanismului molecular al integrării ADN viral într-un cromosom al celulei (după Coffin, 1991).

Oncogenele de origine celulară s-au găsit numai la subfamilia *Oncovirinae*, dar lipsesc la *Lentivirinae* şi *Spumavirinae,* deşi treptele multiplicării sunt aceleaşi.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

23.6.2. Mecanismele oncogenezei cu retravirusuri

Mecanismele posibile ale transformării maligne sub acțiunea retravirusurilor transductoare, sunt multiple.

1) În acord cu *teoria supradozajului*, transformarea malignă este rezultatul *sintezei în exces a oncoproteinelor* codificate de genele transduse. Eficiența transformantă a retravirusurilor transductoare, derivă din faptul că genele *v-onc*, fiind sub controlul promotorului viral, sunt transcrise cu o rată superioară, comparativ cu genele *c-onc*. Dacă oncogena celulară codifică un factor stimulator al sintezei ADN, creşterea ratei diviziunii celulare este prima treaptă spre transformarea malignă.

2) *Captarea a 2 gene v-onc* în acelaşi provirus: cele *6 gene v-onc – myc, myb, mil(raf), ets, erbA, erbB* – sunt fiecare în parte, transformante, dar asocierea lor într-un singur genom viral amplifică starea de transformare apreciată prin caracterele fiziologice ale celulelor.

3) *Sinteza oncoproteinelor modificate*. In celulele normale ale muşchiului pectoral de găină, gena *c-src* codifică *tirozin-kinaza*, o fosfoproteină de 60 kDa, care se inseră în membrana citoplasmatică, cu rolul de a fosforila resturile de tirozină ale câtorva proteine din categoria *integrinelor*. Proteinele tirozin-fosforilate, în celula normală, au rolul de a lega Ca^{2+} şi funcționează ca receptori pentru fibronectină. Activitatea tirozin-kinazei codificată de *c-src* este de numai 10% din aceea a enzimei codificată de gena v-src.

Gena *v-src* codifică o tirozin-kinază uşor modificată față de tirozin-kinaza codificată de gena *c-src*: ultimii 19 aminoacizi ai capătului C-terminal al proteinei *C-src* sunt înlocuiți cu o secvență de 12 aminoacizi în proteina *V-src*. Modificarea are consecințe asupra efectului sau reglator, dar gena *v-src* este transcrisă cu o rată net superioară, fiind sub controlul promotorului viral.

4) *Modificarea poziției genei* este unul dintre mecanismele prin care o genă celulară transdusă devine oncogenă. Studiile pe celule tumorale animale şi umane au arătat că expresia genei *myc* este activată prin 3 mecanisme:

- inserția provirusului;
- amplificare genică;
- translocație cromosomală. Toate cele 3 mecanisme duc la creşterea sintezei proteinei *Myc*. În tumorile umane, activarea genei este rezultatul amplificării genice şi translocației cromosomale.

Câteva carcinoame pulmonare cu celule mici, carcinomul de sân, de cervix şi neuroblastoma au o genă *myc* amplificată. In limfomul Burkitt, translocația între cromosomii 8 şi 14 duce la juxtapoziția oncogenei c-myc cu secvențele reglatoare ale sintezei Ig. Genele reglatoare ale sintezei Ig induc transcrierea cu o rată înaltă a ARNm din genele codificatoare ale limfocitelor B. Dacă gena c-myc este plasată (prin translocație) sub controlul genelor reglatoare ale sintezei Ig, limfocitul B produce cantități mari de ARNm c-myc (în locul ARNm pentru Ig) şi celula este convertită la fenotipul malign.

5) *Activarea unei gene c-onc* sub acțiunea unei proteine virale: proteina virală acționează ca un mitogen.

Oncogeneza cu retravirusuri netransductoare. Multe retravirusuri care nu transduc oncogene celulare, induc tumori după inoculare experimentală la animale: sarcoame, leucemii, carcinoame. Diferența majoră față de virusurile oncogene transductoare, constă în perioada de latență care precede apariția tumorilor: de la câteva săptămîni, la câteva luni (transformarea cronică). Transformarea cronică este un eveniment rar (1 celulă transformată din 10^{10}–10^{15} celule). Nici unul dintre virusurile netransductoare nu induce transformarea malignă a celulelor *in vitro*. Cel mai cunoscut reprezentant al acestui grup este *virusul leucozei aviare*. Tumorile induse de retravirusurile netransductoare au câteva proprietăți definitorii:

- toate celulele unei tumori conțin genomul integrat ca provirus;
- provirusul este integrat în acelaşi situs cromosomal, în toate celulele tumorii;
- celulele tumorii sunt mono- sau *oligoclonale* (identice din punct de vedere genetic), având originea într-o singură celulă sau un număr foarte mic de celule transformate.

Integrarea provirusului se face la situsuri specifice ale unui cromosom, în imediata vecinătate a oncogenelor celulare, ca şi genomul virusurilor transductoare. Consecința directă a integrării genomului viral este *mutageneza prin inserție*, deoarece LTR sunt promotori foarte eficienți. Genomul retraviral fiind integrat în genomul celular la un situs aleatoriu, LTR poate să inducă expresia la un nivel superior a protooncogenelor celulare, consecința fiind transformarea malignă.

Integrarea genomului viral este *mutagenă*, deoarece modifică secvența de baze ADN. Mutațiile induse în oncogenele celulare pot avea două efecte: stimulează activitatea unei gene sau o inactivează.

Modificarea activității oncogenelor celulare constituie esența mecanismului molecular al transformării maligne și a fost explicată prin mai multe teorii:

1) *teoria supradozajului* consideră că transformarea malignă este rezultatul stimulării activității unei oncogene și a sintezei în exces a oncoproteinei pe care o codifică. Gena *c-onc* din proximitatea situsului de integrare a provirusului trece în subordinea *promotorului viral* și va fi transcrisă cu o rată superioară celei normale. Oncoproteina corespunzătoare se sintetizează în exces, are acțiune stimulatoare și activează necontrolat rata diviziunii celulare;

2) *teoria activării genelor c-onc* sub acțiunea inductoare a provirusului consideră că genele *c-onc*, în mod obișnuit sunt parțial sau total represate, dar se activează după integrarea provirusului în imediata lor vecinătate. Se sintetizează oncoproteine, inductoare ale transformării maligne. Acesta este fenomenul *activării prin inserție* sau al *cis-activării oncogenelor celulare*, consecutiv trecerii lor sub controlul promotorului viral;

3) *reorganizarea proceselor celulare* de transcriere de către o proteină virală transactivatoare: transactivarea este ilustrată de HTLV I, care produce leucemia celulelor TCD_4^+ la adult (ATL). Este o malignitate care apare la 0,1 – 1% dintre cei infectați, după o perioadă lungă de latență. Mecanismul transformării este diferit: provirusul este integrat la situsuri nespecifice în genomul celulei, iar HTLV nu are oncogenă proprie. Virusul codifică o proteină (Tax), capabilă să transforme celulele limfoide și nelimfoide. *Tax* are rolul de a transactiva gene celulare implicate în controlul diviziunii limfocitelor T, prin interacțiunea directă sau indirectă cu factori de transcriere celulară: gena pentru sinteza IL-2, a IL-2R, precum și protooncogene (*c-sis, c-fos*).

4) *inactivarea antioncogenelor* este un alt efect al mutagenezei prin inserție. *Antioncogenele* sunt inactivatoare ale protooncogenelor. Ele codifică proteine *supresoare ale protooncogenelor* celulare, al căror rol este menținerea funcțiilor normale ale celulei. De exemplu, retinoblastomul (o tumoră retiniană ce apare la vârsta copilăriei) se datorează pierderii ambelor copii ale genei *rb*. Fosfoproteina *RB*, cu localizare nucleară, are rol important în reglarea ciclului celular, controlând intrarea celulei în ciclul mitotic. Absența proteinei *RB,* are ca efect proliferarea necontrolată a celulelor retiniene.

Gena p-53, supresoare a oncogenelor poate fi inactivată prin inserția unui provirus la ambele alele, sau prin combinarea unui eveniment de inserție, cu pierderea celeilalte alele prin deleție.

Genele *c-onc* se pot activa independent de infecția virală sub acțiunea *mutațiilor*, chiar *punctiforme*, care apar în interiorul lor. Substituția unui singur aminoacid al oncoproteinei este suficientă pentru a converti o oncoproteină reglatoare, într-o proteină cu caracter transformant.

Activarea oncogenelor ar putea fi rezultatul *translocației unei protooncogene* într-o nouă localizare cromosomală. De exemplu, în celulele limfomului Burkitt, schimbul de fragmente între cromosomii perechilor 8 și 14 are o frecvență de 90%. Schimbul între cromosomii perechilor 8 și 2, ca și între perechile 8 și 22 are o frecvență de 5%. In toate cazurile are loc translocația unui fragment al unui cromosom din perechea 8. Acest fragment conține protooncogena *c-myc*, care astfel este translocată adiacent față de o genă reglatoare a sintezei anticorpilor. In noua localizare a genei, oncoproteina *c-myc* este sintetizată în exces.

Oncogenele celulare mediază transformarea malignă indusă de virusuri, dar și de factorii fizici și chimici cu acțiune mutagenă.

Infecțiile cu retravirusuri potențial oncogene, la om și animale sunt mult mai frecvente decât incidența tumorilor. Pentru ca transformarea malignă a celulei să se producă, este necesar ca simultan cu infecția virală, să acționeze alți factori cu efect sinergic, denumiți factori *co-carcinogeni*. Aceștia pot fi factori intrinseci (genetici, hormonali, imunologici) sau factori ai mediului extern (substanțe chimice potențial cancerigene, radiații). Factorii co-carcinogeni interni sau externi potențează evoluția spre malignizare a infecției cu virusuri oncogene.

Virusurile leucemice. Leucemiile pot fi produse de virusuri atât la om (leucemia celulelor T la adult), cât și la animale (șoarece, păsări, pisică, cornute). Virusurile leucemice sunt netransductoare și produc transformarea cronică, după o lungă perioadă de latență. Oncogenitatea lor se datorează stării integrate în genomul celulei țintă (virusul leucozei aviare -ALV, virusul leucemiei murine Moloney – MoLV) sau activității proteinelor transactivatoare, care activează intens ciclul de multiplicare virală, dar în același timp perturbă mecanismele reglatoare ale diviziunii celulei și/sau diferențierea lor (HTLV I, virusul leucemiei bovinelor).

În transformarea acută produsă de virusurile transductoare, activarea întregii cascade este un proces de scurtă durată. Apariția leucemiei la om şi animale este un proces multistadial, deoarece virusurile care produc transformarea cronică, se presupune că influențează determinanți minori ai procesului neoplazic şi de aceea este necesară o stimulare cronică înainte de apariția leucemiei.

Bibliografie

Lowy D. R. 1985. Transformation and Oncogenesis: Retroviruses, în vol. Virology, edited by B. N. Fields et al., Raven Press, New York.

Neil J. C., Wyke J. A. 1998. Viral Oncogenicity, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Benjamin T., Vogt P. K. 1991. Cell Transformation by Viruses, în vol. Fundamental Virology, sec. Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

Nevins J. R., Vogt P. K. 1996. Cell Transformation by Viruses, în vol. Fields Virology, third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

23.8. Dezoxiribovirusuri oncogene

Un număr mare de virusuri cu genom ADN, infecțioase în condiții naturale pentru o largă varietate de specii animale şi pentru om, au capacitatea de a induce transformarea malignă a celulelor *in vitro* sau să inducă tumori la animalele de laborator. Unele determină formarea tumorilor chiar la gazdele lor naturale.

Virusurile oncogene ADN cuprind:

l) *Papilomavirusuri* (peste 60 de serotipuri izolate de la om şi numeroase serotipuri animale);

2) *Poliomavirusuri* (SV_{40}, virusul polioma murin şi virusurile umane BK şi JC);

3) *Adenovirusuri* (cu numeroase variante antigenice umane şi animale);

4) *Herpesvirusuri* (virusul Epstein-Barr, virusul bolii Marek, al carcinomului renal Lucke al broaştei leopard);

5) *Virusurile hepatitice* (virusul hepatitei B umane).

Efectul transformat rezidă în capacitatea de diviziune a celulelor, iar dacă nu se divid sau se află în faza G_0, virusurile tumorale ADN induc intrarea celulelor în faza S.

Papilomavirusurile induc carcinomul cervixului uterin, virusul Epstein-Barr induce limfomul Burkitt şi carcinomul nazofaringian, iar virusul hepatitei B este asociat cu carcinomul hepatocelular. Polioma şi adenovirusurile au activitate transformantă numai în sistemele experimentale *in vitro*, dar rolul lor în inducerea tumorilor umane sau animale nu s-a demonstrat.

Toate virusurile oncogene ADN au simetrie icozaedrică, cu dimensiuni cuprinse între 40-l00 nm şi sunt nude, cu excepția herpesvirusurilor.

Spre deosebire de retravirusuri, la care oncogenele sunt de origine celulară, genele transformante ale oncodnavirusurilor sunt *gene virale esențiale* pentru desfăşurarea ciclului de multiplicare virală. Ele nu au corespondență printre genele celulare normale. Genele virale oncogene (transformante) au fost caracterizate prin evidențierea rolului lor în ciclul multiplicării acestor virusuri.

Transformarea malignă cu oncodnavirusuri nu este asociată cu producerea virusului progen, deoarece transcrierea programului tardiv este blocată.

Cercetările de genetică moleculară au evidențiat că genomul virusurilor oncogene ADN, din punct de vedere funcțional, poate fi împărțit în mod convențional, în două regiuni distincte, în raport cu momentul transcrierii lor:

a) *gene timpurii*, a căror transcriere precede replicarea ADN;

b) *gene tardive*, transcrise după replicarea genomului viral.

Pornind de la aceste concluzii, s-a dedus că interacțiunea oncodnavirusurilor cu celula, este modulată genetic pe două căi distincte:

În *celulele permisive* sunt transcrise ambele programe genetice. Se sintetizează molecule de ARNm timpurii şi tardive, care sunt traduse în proteine virale. Ciclul multiplicării virale este complet. Infecția ete productivă: se asamblează şi se eliberează virus progen, iar celula se lizează.

În *celulele nepermisive*, este transcrisă informația genetică *timpurie* şi numai parțial, programul tardiv al genomului viral. Celulele nepermisive provin de la organisme sau din țesuturi pe care virusul nu le infectează în condiții naturale.

BCU "CAROL I" - UNIVERSITY LIBRARY

După transcrierea strict limitată a informației genetice, un factor celular blochează transcrierea celorlalte gene ale programului tardiv. Ciclul multiplicării virale este stopat înainte de replicarea genomului şi nu se asamblează virus progen. Genomul viral este degradat ori se diluează prin diviziunea celulelor. Rezultatul interacțiunii virusului cu celula nepermisivă, de cele mai multe ori, este *infecția abortivă**, fără consecințe detectabile.

* În infecția abortivă virusul progen nu este produs, pentru că substratul este nepermisiv, adică nu suportă expresia programului genetic viral sau pentru că virionii infecțioşi sunt defectivi.

Dacă genomul viral persistă în stare fizic *independentă* sau *integrată* într-un cromosom al celulei, are loc *transformarea malignă*. Oncogenele virale codifică proteinele necesare permanent pentru menținerea fenotipului transformant al celulei.

ADN viral se poate integra în ADN celular, *la un situs specific sau la un situs aleatoriu.* Integrarea la situs specific este probabil condiționată de *proteine virale* care recunosc o secvență a ADN celular, dar nu par a avea rol în procesul fizic al integrării. Integrarea ADN viral nu are rol în propagarea virusului, nefiind o treaptă obligatorie a multiplicării virale. După pierderea genomului viral, celula reversează la starea normală.

Transformarea *malignă* cu virusuri oncogene ADN este un eveniment rar (sub $1/10^5$) şi necesită un mare număr de particule virale infecțioase/celulă. Ineficiența procesului de transformare, reflectă absența mecanismelor specifice de integrare a ADN viral în cromosomii celulei. Genele virale oncogene au o probabilitate mică să fie integrate într-o stare care să permită transcrierea.

Mult mai frecventă este *transformarea abortivă*, caz în care infecția celulelor nepermisive este urmată de exprimarea genelor timpurii. Tranzitoriu, celula dobândeşte caractere care denotă procesul de transformare, dar ulterior, după pierderea ADN viral, reversează la fenotipul normal şi ADN viral se pierde.

Condiția transformării maligne este păstrarea genomului viral în celulă în stare integrată sau fizic autonomă şi întreruperea transcrierii genelor virale tardive.

Consecințele majore ale integrării genomului viral sunt cele *mutagene* şi se manifestă prin următoarele evenimente:

1) *inactivarea genei* celulare, ca rezultat al integrării genomului viral în secvența ei sau datorită *separării* genei de promotorul ei. Dacă gena are un rol reglator, consecința este perturbarea proceselor celulare dependente de gena inactivată;

2) integrarea poate să pună o genă a celulei sub controlul unui *promotor viral* mult mai activ şi rezultatul este o supraproducție a proteinei codificată de o genă;

3) integrarea genomului viral poate să provoace *ruperea unui cromosom* celular şi rearanjarea lui, astfel încât poate altera expresia genelor;

4) *unul sau mai multe produse ale genelor virale* pot, direct sau indirect, să determine transformarea. Oncoproteinele codificate de oncogenele virale formează complexe cu proteinele celulare normale şi le alterează funcțiile, *stimulând celulele aflate în faza G_o să intre în ciclul celular.* Stimularea ratei activității mitotice a celulelor este prima treaptă a transformării maligne. Acțiunea oncoproteinelor este în acord cu ipoteza supradozajului.

Virusurile oncogene se deosebesc de fagii lizogeni prin faptul ca *nu codifică represori*, astfel încât transcrierea ADN viral integrat se face continuu. Bacteriofagul integrat necesită sinteza unui *represor* propriu pentru menținerea stării lizogene, pentru a preveni activarea funcțiilor virale, ce produc liza bacteriei. La retravirusuri, represorul nu este necesar, deoarece celula transformată este concomitent producătoare de particule virale progene. La oncodnavirusuri, genele transformante aparțin programului timpuriu şi transcrierea lor este permanentă, fiind necesară pentru menținerea stării transformate. De aceea, nu este necesară sinteza represorului.

Detectarea ADN integrat. In studiul interacțiunii transformante virus-celulă se urmăreşte detectarea ADN viral, integrat sau în stare fizic autonomă, numărul şi localizarea secvențelor de ADN viral, în celula transformată.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dovada concludentă a prezenței ADN viral în celulele transformate este adusă de experiențele de hibridare prin metoda *Southern blotting* (ADN este în gel, iar ARN marcat, cu secvența cunoscută, este utilizat ca probă). ARN marcat (radioactiv sau cu digoxigenină), obținut prin transcrierea *in vitro* a ADN viral (polioma, SV_{40} etc.) hibridează cu ADN izolat din celulele transformate cu virusul corespunzător, dar nu hibridează cu ADN izolat din celulele normale.

ADN viral se poate integra sau rămâne sub formă fizic independentă în celulele transformate malign.

Pentru hibridare, ADN din celulele transformate cu un oncodnavirus se purifică și se secționează la situsuri întâmplătoare. Rezultă fragmente cu un spectru larg al gr. mol., dar mai mari decât al ADN viral. Fragmentele sunt fracționate prin centrifugare zonală și fiecare fracție se testează pentru prezența ADN viral, prin denaturare și hibridare cu ARN viral marcat.

Fragmentele de ADN celular care conțin ADN viral integrat, pot avea dimensiuni foarte diferite. De aceea, ARN marcat (din probă) hibridează cu fragmente de ADN de orice dimensiuni.

Dacă ADN viral se găsește în celulă în stare fizică autonomă, toate copiile sale sedimentează unitar, datorită uniformității masei moleculare a copiilor.

Pentru SV_{40}, ADN integrat în ADN celular s-a identificat cu ADN viral denaturat, marcat cu P^{32}. Rezultatele au evidențiat că ADN de SV_{40} se integrează la un singur situs cromosomal, dar unele celule transformate conțin două secvențe de ADN viral, integrate la situsuri cromosomale diferite.

Experiențele de fuziune celulară, mediată de virusul Sendai, arată că genomul SV_{40} se integrează în mai multe situsuri diferite ale ADN celular, situsuri care se găsesc pe mai mulți cromosomi. Celulele umane și de șoarece, a căror fuziune este indusă de virusul Sendai, formează hibrizi instabili care pierd la întâmplare cromosomii umani, până ce rezultă linii stabile ce au setul complet de cromosomi de șoarece și numai câțiva cromosomi umani. Celulele normale de șoarece au fost fuzionate cu celule umane transformate cu SV_{40}. S-au obținut clone stabile, ce se aseamănă cu celulele de șoarece, dar sunt transformate. Cromosomii umani se disting ușor de cei de șoarece în metafază. Pe această cale, celulele murine transformate pot fi analizate pentru identificarea cromosomilor umani pe care îi conțin. Analiza mai multor clone de celule a sugerat ca ADN de SV_{40} este integrat în mai mulți cromosomi.

Structura ADN viral integrat. Integrarea genomului oncodnavirusurilor într-un cromosom celular nu este esențială pentru desfășurarea ciclului de multiplicare și se produce cu o rată scăzută. Integrarea ADN viral are cele mai mari șanse să se producă în celulele nepermisive. Deoarece ciclul multiplicării este stopat, nu există presiune selectivă pentru păstrarea tuturor secvențelor codificatoare ale genomului viral. In unele cazuri, s-a demonstrat ca integrarea este însoțită de pierderea informației genetice virale: se produc deleții și inversii.

Cazul extrem al pierderii informației genetice, s-a observat la adenovirusuri. Clonele celulare transformate conțin totdeauna ADN viral integrat, dar secvențele virale nu reprezintă niciodată o moleculă genomică virală întreagă. Diferitele clone celulare conțin secvențe virale diferite, dar totdeauna un segment de ADN genomic este prezent în celulele transformate. Aceasta denotă că o anumită genă sau un set de gene virale sunt esențiale pentru transformare.

23.8.1. Transformarea cu poliomavirusuri

Genul *Polioma* (denumirea reflectă capacitatea lor de a induce tumori cu localizări multiple la puii de rozătoare) include virusurile vacuolante (SV_{40}), virusul polioma murin și virusurile umane BK și JC.

Virionii *Polioma* (Pi) sunt nuzi, au simetrie icozaedrică, cu diametrul de 45 nm, genom ADN dc, de 4,7–5,2 kb.

Virusul polioma murin este endemic la șoarecele de laborator și la cel sălbatic, la care produce infecții persistente ale celulelor epiteliale neciliate ale bronhiilor și bronhiolelor. Infecția cu Pi este inaparentă și persistentă. Virusul s-a găsit în diferite organe și în excreta. Tractul urinar pare a fi sursa persistenței și răspândirii virusului prin urină în populațiile de șoareci. Ciclul de multiplicare este litic și se eliberează virus progen. Virusul Pi s-a găsit și la șobolan, iar la păsări produce numai infecții acute. In condiții naturale, Pi produce tumori cu o rată scăzută.

Multiplicarea Pi este dependentă de gradul de diferențiere celulară.

Funcțional, genomul cuprinde setul de gene timpurii și al genelor tardive. In *celulele permisive* sunt transcrise ambele programe, iar în cele nepermisive sau semipermisive este transcris numai setul de gene al programului timpuriu, codificatoare pentru *antigenele T* (*T*umorale). Antigenele T sunt proteine oncogene, stimulatoare ale sintezei ADN celular, o condiție preliminară a intrării celulei în faza S și a transformării maligne, dar și a ciclului de multiplicare litică.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Virusul simian 40 (SV_{40}), în condiții naturale, infectează persistent, rinichiul* maimuțelor de *Cercopithecus aetiops* și *Macaccus rhesus*, fără manifestări clinice.

* Culturile celulare de rinichi de *M. rhesus* au fost folosite pentru producerea vaccinului polio. Zeci de milioane de copii au primit SV_{40} cu titru mic sau mare, odată cu vaccinul polio. Ulterior s-a descoperit că SV_{40} induce tumori la puii de rozătoare și se suspectează rolul său în inducerea unor tumori umane.

Datele recente de PCR sugerează un rol posibil al lui SV_{40} în inducerea mezoteliomului*, osteosarcomului, a tumorilor de plex coroid și altor tumori ale creierului.

* Mezoteliomul este o tumoră care apare difuz pe suprafețele pleurale. Expunerea la pulberea de azbest și efectul sinergic al fumatului sunt factori majori de risc pentru această tumoră. Latența este lungă (circa 20 de ani) și constituie o problemă de sănătate publică.

Virusurile Pi și SV_{40} codifică sinteza antigenelor T, proteine multifuncționale. ARNpm transcris din gena codificatoare a SV_{40} este sudat diferit și rezultă două molecule de ARNm traduse în Ag T și t. Ag T este format din 708 aminoacizi, iar Ag t are ultimii 82 aminoacizi ai Ag T și 97 aminoacizi codificați de o secvență intronică a genei codificatoare. Ag T suferă modificări post-traducere, ce include acilarea, glicozilarea, ribozilarea, adenilarea, fosforilarea. Modificările modulează activitatea și distribuția proteinei în celulă. Antigenul T este format din câteva domenii funcționale. Unul dintre domenii se leagă cu molecula de ADN, în special monocatenar. Secvența de legare separă promotorii ce controlează genele timpurii de promotorii celor târzii. Alt domeniu al moleculei T are activitate ATP-azică, stimulată după legarea a ADN mc. După legarea ATP, Ag T se organizează în structuri supramoleculare hexamerice. Hexamerul funcționează ca helicază a ADN, enzimă ce despiralizează ADN.

Antigenul T de 100 kDa are o localizare aproape exclusiv *nucleară*, atât în celulele infectate, cât și în cele transformate. Proteina se asociază cu ADN viral și reglează câteva trepte cheie ale ciclului de multiplicare: transcrierea ARNm timpuriu și tardiv, replicarea ADN. Antigenul viral se asociază și cu *proteina p53* – o fosfoproteină nucleară, cu rol inhibitor al diviziunii celulare și cu *Rb* și formează complexe inactive. Astfel, p53 și Rb își pierd funcția inhibitorie a progresiei ciclului celular, favorizând intrarea celulei în faza S a ciclului celular și replicarea ADN viral. Inactivarea funcției proteinelor codificate de GST este esențială pentru transformarea mediată de virus. Antigenul T induce expresia câtorva factori necesari pentru progresia ciclului celular: ciclina A, B etc.

Antigenul T de 55 kDa (mijlociu) este o proteină fosforilată, care se asociază cu proteina celulară de 60 kDa (p60), codificată de protooncogena *c-src*, o kinază tirozin-specifică. Interacțiunea *p60* cu antigenul viral, determină o stimulare de circa 50 de ori a activității tirozin-kinazice a proteinei *Src* și concomitent, perturbarea mecanismului său de reglare negativă.

Antigenul t nu este necesar pentru multiplicarea virală, dar stimulează sinteza ADN, este necesar pentru transformarea eficientă a celulelor oprite în ciclul de creștere și stimulează intrarea celulei în faza S.

Menținerea stării transformate necesită sinteza continuă a proteinelor virale T.

În celulele transformate, setul genelor tardive nu este transcris și celulele nu produc virus progen.

SV_{40} și Pi, după inoculare experimentală, induc tumori cu localizări multiple la puii nou născuți de șoarece, de hamster, de șobolan sau *in vitro* transformă celulele lor.

Genomul viral, de obicei, este integrat în ADN celular.

Poliomavirusurile BK și *JC** (inițialele numelor pacienților) infectează timpuriu în copilărie și sunt ubicvitare în populația umană. Sunt virusuri mici (diametrul de 40 nm), nude.

Capsida, cu simetrie icozaedrică, este alcătuită din 360 molecule de VP 1 distribuite în 72 de capsomere pentamerice. Fiecare capsomeră conține 5 molecule de VP 1 (360 : 72 = 5) și o moleculă de VP 2 sau VP 3.

* Virusul JC s-a izolat în 1971 din creierul unui pacient cu *leucoencefalopatie multifocală progresivă* (LMP), o maladie neurodegenerativă. BKV s-a descoperit în sedimentul urinar al unui pacient cu transplant renal și are tropism pentru epiteliul tractului urinar: infectează epiteliul calicelor renale, al pelvisului renal, al ureterelor și vezicii urinare, prostata. Se cultivă în culturile de rinichi embrionar, amnios. Cele două virusuri sunt diferite și aglutinează hematiile de grup 0.

Receptorii celulari pentru BKV şi JCV sunt resturile de acid sialic, deoarece tratamentul eritrocitelor cu neuraminidază anulează efectul hemaglutinant. JCV se multiplică în cultura primară de celule gliale fetale umane, bogate în spongioblaste, precursoare ale oligodendrocitelor. Celulele gliale ale fătului uman sunt greu disponbile: o linie celulară glială s-a obţinut prin imortalizarea astrocitelor cu ADN de SV_{40} defectiv pentru multiplicare, care exprimă proteina T la nivel crescut.

Ciclul de multiplicare poate fi divizat în 3 faze. În faza precoce sunt transcrise genele timpurii, codificatoare ale proteinelor T cu rol reglator. În faza a II este iniţiată replicarea ADN viral. Curând după iniţierea replicării ADN, urmează faza tardivă, în care este transcris ARNm tardiv. Se sintetizează proteinele virale şi se asamblează virioni progeni. Genele tardive se exprimă eficient numai după replicarea ADN, dar cele timpurii continuă să se exprime şi în stadiul tardiv şi codifică factorii de transcriere.

Pi umane au tropism pentru celulele diferenţiate, în repaus. Antigenele T stimulează intrarea celulei în faza S a ciclului celular, consecinţa fiind uneori, transformarea malignă a celulei.

Infecţia cu JCV se produce, la majoritatea indivizilor (circa 90%), în primele 2 decade de viaţă. Nu este cunoscută poarta de intrare a virusului şi nici celulele în care virusul se multiplică iniţial. Infecţia primară este asimptomatică. Ambele virusuri infectează persistent rinichiul şi ţesutul limfoid al persoanelor sănătoase. Infecţia rămâne latentă şi se activează în condiţiile *imunosupresiei* prelungite (transplant, sarcină, îmbătrânire). Reactivarea procesului infecţios şi eliminarea virusului în urină sunt asimptomatice la imunocompetenţi. La persoanele imunosupresate, în special cu depresia IMC, JCV dobândeşte acces la SNC şi produce o maladie demielinizantă, *leucoencefalopatia multifocală progresivă* (LMP) umană, o maladie *neurodegenerativă* demielinizantă letală a creierului. JCV infectează oligodendrocitele (celulele care mielinizează axonii) şi produce demielinizare multifocală. Consecinţa indirectă este necroza neuronilor, pentru că supravieţuirea lor este dependentă de oligodendrocite. Demielinizarea este un proces multifocal, cu localizări multiple: în emisferele cerebrale, corpii striaţi, talamus, cerebel, trunchiul cerebral. Pacienţii cu LMP par să aibă deficienţă a IMC şi au frecvent tumori limfatice. Majoritatea sunt pacienţi SIDA.

Macrofagele pline cu lipide migrează frecvent în ariile demielinizate, pentru a fagocita resturile de mielină degradată. Pe măsura progresiei procesului patologic, ariile demielinizate devin confluente şi devin vizibile la examinarea secţiunilor cu lupa.

LMP progresează la stadiul letal în 4-6 luni, deşi uneori semnele clinice şi simptomele rămân stabile o lungă perioadă de timp. Clinic, simptomele LMP la momentul prezentării sunt deficitul vizual, deficit motor şi mental (labilitate emoţională, slăbirea memoriei, demenţă).

LMP este singura maladie demielinizantă a creierului uman, al cărei agent etiologic este un virus. Diagnosticul LMP este imagistic, prin tomografie computerizată: leziunile de demielinizare apar în special în aria parieto-occipitală, la joncţiunea substanţei albe cu substanţa cenuşie a cortexului şi nu urmează distribuţia vasculară (Major şi colab., 1992). Metoda optimă pentru diagnosticul LMP este biopsia din creier. Prin hibridarea *in situ* pe materialul inclus în parafină sau pe secţiuni obţinute la criotom, s-a relevat prezenţa ADN-JCV în creierul pacienţilor. Metoda detectează celulele în care virusul se multiplică productiv, deoarece trebuie să fie prezente sute de copii ale genomului viral. Metoda imunocitochimică utilizează Ac anti-antigenul T şi anti-antigenele capsidei. In celulele pozitive pentru antigenele capsidei, transcrierea şi traducerea genomului viral sunt procese active, adică infecţia este productivă.

PCR poate fi utilă pentru diagnosticul LMP: ADN de JCV s-a detectat în biopsiile de creier, în LCR şi chiar în limfocitele circulante ale pacienţilor LMP.

Celulele creierului pacienţilor cu LMP nu evidenţiază antigene virale. Sediul latenţei nu este creierul, dar ar putea fi *limfocitul B*, în măduva osoasă, deoarece IF cu AMC evidenţiază antigenul JCV. Virusul se diseminează în creier pe cale hematogenă, în condiţii imunodeficitare sau de imunosupresie. Leziunile demielinizante sunt multiple şi sunt localizate la joncţiunea substanţei albe cu substanţa cenuşie, unde se găsesc arteriolele terminale ale arborelui cerebrovascular, ceea ce susţine ipoteza diseminării hematogene. Virusul s-a detectat în urina pacienţilor cu LMP şi cu transplant renal, precum şi la femeile gravide, ceea ce sugerează că sediul *latenţei ar fi tractul urogenital.*

Infecţia primară nu este asociată cu manifestări clinice. Înainte de era SIDA, incidenţa LMP era maximă la pacienţii în cea de a 6-a decadă de viaţă, ceea ce sugerează că infecţia are loc în primele

2 decade, virusul rămâne latent şi se activează la cei care fac LMP. Majoritatea pacienţilor LMP au deficit al IMC, ceea ce ar favoriza reactivarea infecţiei. După '80, numărul cazurilor LMP a crescut datorită epidemiei HIV. Majoritatea pacienţilor LMP au SIDA.

Limfocitul B de memorie ar fi substratul celular adecvat pentru latenţa JCV, datorită absenţei factorilor de transcriere, dar genomul viral poate fi activat odată cu reactivarea limfocitului de memorie. Limfocitele de memorie reactivate ar traversa bariera sânge creier în absenţa Ag specific, mediind diseminarea virusului.

Virusul BK şi rareori virusul JC produc infecţii hemoragice (cistită) ale tractului urinar la pacienţii transplantaţi.

Cele două virusuri, inoculate intracerebral şi subcutan la puii de hamster, produc tumori gliale şi alte tumori neclasificate. Transformarea este consecinţa unei infecţii *neproductive* sau *abortive*.

Potenţialul oncogen. JCV, BKV şi SV_{40} induc tumori după inoculare la animalele de laborator şi transformă celulele lor *in vitro*. Tipul tumorii depinde de specie, vârsta şi situsul inoculării.

Curând după infecţia virală, atât în celulele permisive, cât şi în cele nepermisive, are loc creşterea accentuată a enzimelor ce catalizează sinteza ADN. Creşterea este detectabilă chiar în celulele blocate în faza G_1 (fază în care sinteza ADN este stopată). Enzimele iniţiază nu numai sinteza ADN viral, ci şi sinteza ADN celular.

Expresia Ag *LT* (Large T) poate duce la transformarea malignă a celulei. Ag *t* asistă transformarea unor tipuri de celule, iar alteori sinteza sa este suficientă pentru a induce fenotipul transformant.

Mecanismul transformării cu virusurile polioma pare a fi *'hit and run'*, adică expresia Ag LT este necesară pentru iniţierea procesului multistadial al transformării, dar nu mai este necesară după ce s-a atins un stadiu critic al transformării.

Alt mecanism prin care Ag LT polioma produce transformarea constă în inducerea alterărilor structurale ale cromosomilor: ruperi, lacune cromatidice (ruperea unei cromatide, cu păstrarea fragmentului în poziţia iniţială), cromosomi dicentrici şi inelari, deleţii, duplicaţii, translocaţii.

Mecanismul molecular al efectului clastogen (perturbarea mitozei cu formarea punţilor cromatice, cromosomi întârziaţi, minicromosomi) al Ag LT BKV s-ar datora capacităţii sale de a lega topoizomeraza I sau activităţii sale de helicază, prin care induce leziuni cromosomale în timpul despiralizării catenelor ADN celular. Deoarece Ag LT inactivează p53, celulele lezate supravieţuiesc şi creşte şansa transformării maligne. Activităţile clastogene şi mutagene ale Ag LT codificate de JCV şi BKV perturbă funcţia genelor care menţin stabilitatea genomului: oncogene, GST, genele pentru repararea leziunilor ADN.

Virusurile JC şi BK se cultivă cu mare dificultate, dar nu în scopul diagnosticului. Ambele pot fi detectate cu PCR, iar BKV se poate evidenţia pe imaginile electrono-optice, în urină. Testele serologice sunt inutile datorită nivelului înalt (80%) al contaminării populaţiei.

Căile de transmitere ale celor 2 virusuri nu se cunosc.

23.8.2. Transformarea cu papilomavirusuri

Papilomavirusurile – o familie mare, distribuite în 16 genuri, prezintă un interes ştiinţific şi practic deosebit, deoarece s-au izolat de la primate, bovine, iepurele de vizuină din vestul SUA şi de la diferite specii de păsări. Virionii sunt nuzi, cu diametrul de 55 nm şi simetrie icozaedrică.

Genomul papiloma este o moleculă de ADN dublu catenară, circulară închisă, de 7,2–8 kbp, asociat cu proteine histonice celulare şi formează o structură asemănătoare cromatinei. Informaţia genetică este transcrisă de pe o singură catenă şi este organizată în cel puţin 8 ORF.

Din punct de vedere funcţional, genomul poate fi împărţit în trei regiuni:

– regiunea necodificatoare (LRR – long regulatory region), conţine elementele reglatoare ale transcrierii şi replicării (l0% din genom);
– regiunea transcrisă *timpuriu E* (*E*arly);
– regiunea transcrisă *tardiv* (L).

Virusurile Papiloma induc formarea tumorilor benigne (negi, veruci) pe tegument şi mucoase, care de obicei regresează, dar cel puţin 3 reprezentanţi au potenţial oncogen:

– virusul papilomului Shope;
– virusul fibropapilomului bovin;
– papilomavirusul tractului digestiv al bovinelor.

Virusurile *Papiloma* nu se multiplică în culturi de celule, cu excepția celor foarte specializate (culturi de keratinocite). *In vivo*, se multiplică în epiteliul squamos al mucoaselor și al epiteliilor keratinizate.

Majoritatea indivizilor sunt infectați cu papilomavirusurile (HPV1, 2, 3, 4) care produc negi, *tumori benigne epiteliale* și *fibroepiteliale* în copilărie și adolescență. Tumorile epiteliale denumite *papiloame** (negi, veruci) pot progresa uneori spre carcinoame, prin proliferare, după străpungerea membranei bazale.

*Originea virală a leziunilor papilomatoase a fost intuită de Ciufo (1907): filtratele acelulare ale negilor transmit leziunile. Primul virus al acestui grup a fost descoperit de Shope (1933) la iepurele de vizuină. Virusul produce o papilomatoză cutanată, care în 25% din cazuri, progresează la un carcinom celular squamos, evoluția malignă fiind accelerată de metilcolantren și de gudronul de cărbune. In condiții experimentale, virusul infectează și iepurele domestic, iar papiloamele progresează spre carcinom în proporție de 75%.

La om s-au identificat peste 106 de genotipuri de papilomavirusuri, notate *HPV* (*H*uman *P*apilloma *V*irus) urmat de o cifră. Creșterea rapidă a numărului de genotipuri identificate este rezultatul direct al utilizării tehnicii PCR. Numeroasele genotipuri se grupează după *gradul de omologie a nucleotidelor*. Cele 106 tipuri genomice au o omologie a nucleotidelor mai mică de 90%. In interiorul tipurilor, identitatea secvențelor cuprinsă între 90–98% corespunde *subtipurilor*, iar izolatele cu o identitate mai mare de 98% a nucleotidelor corespund *variantelor*.

HPV au specificitate înaltă de gazdă și tisulară. Omul nu este sensibil la PV aviare, iar HPV nu infectează alte specii. La bovine, maimuțe etc., s-au descris peste 20 de tipuri de papilomavirusuri. Unele produc *papiloame* (tumori benigne derivate din celulele epiteliale), altele produc *fibropapiloame* (tumori benigne formate din celule epiteliale și din țesut conjunctiv fibros) sau *fibroame* (tumori benigne formate din țesut conjunctiv fibros și fibroblaste proliferante).

Subgrupele de virusuri au tropisme pentru situsuri și țesuturi specifice. HPV infectează cheratinocitele, epiteliile cheratinizate și necheratinizate squamoase pluristratificate.

HPV mucotrope infectează în special tractul urogenital, dar pot infecta și cavitatea orală, laringele și produc leziuni recurente. Recurențele se datorează faptului că prin intervenția chirurgicală sunt extirpate leziunile vizibile, dar zonele învecinate pot să aibă celule infectate. Peste 30 de genotipuri formează un subgrup ce infectează celulele epiteliale ale tractului *anogenital*. Variantele ce infectează tractul genital* sunt de două categorii: de *risc mare* și de *risc scăzut*. Cele de risc scăzut (HPV-6 și 11) produc numai negi genitali benigni și infecția se transmite pe cale sexuală. Cele de risc mare (HPV-16, 18, 31, 33, 45) sunt asociate cu dezvoltarea tumorilor anogenitale. O țintă majoră a HPV oncogene genitale este epiteliul squamos la joncțiunea squamo-columnară a cervixului uterin. Aproape toate leziunile intraepiteliale precanceroase și ale carcinomului invaziv sunt originare în zona de tranziție. Intervalul între expunere și apariția leziunii este variabil: câteva săptămâni, câteva luni sau mai mult. Virusul pătruns în tractul genital feminin, ajunge prin microleziuni ale mucoasei, la celulele stratului bazal, care se divid. În aceste celule s-a evidențiat ADN și ARN viral. Genomul ADN poate să persiste perioade lungi în celulele stratului bazal, fără să producă modificări morfologice. Pe măsură ce celulele care conțin ADN viral ajung în straturile superioare ale epiteliului, ciclul de multiplicare este activat și se asamblează virioni progeni. Celulele infectate au nucleu mare, hipercromatic.

* Cele care infectează tractul genital sunt transmise pe cale sexuală. Se estimează că circa 2/3 dintre indivizii care au relații sexuale cu un partener infectat, se infectează. Majoritatea infecțiilor sunt subclinice. Infecțiile cu HPV de risc înalt nu sunt limitate la tractul genital, deoarece circa 20% din neoplaziile orofaringiene conțin ADN al HPV anogenitale.

Infecția tractului genital cu HPV poate produce inițial, leziuni ușoare (displazii) sau neoplazii cervicale intraepiteliale de *gradul I*, cu un grad mediu de alterare a diferențierii celulare. Multe celule sunt eliminate de sistemul imunitar în mai puțin de un an. Unele celule ale displaziilor nu sunt eliminate de sistemul imunitar și persistă perioade lungi, de câteva decade. Persistența infecției cu HPV de risc înalt constituie un factor major al dezvoltării malignităților genitale: carcinomul cu celule squamoase și mai rar, adenocarcinomul de col cervical.

HPV_1 şi HPV_4 produc negi plantari, iar HPV_2 produce negi ai mâinii, leziuni proliferative benigne. Alte 20 de tipuri infectează tegumentul pacienţilor cu *epidermodisplazie veruciformă* (EV), caracterizată prin verucoză extensivă. Pacienţii EV au leziuni maculare persistente, pe arii tegumentare extinse, ce tind să devină coalescente (confluente). La pacienţii cu EV s-a evidenţiat o relaţie directă între HPV şi neoplazia tegumentară: mulţi pacienţi EV fac carcinom tegumentar al celulelor squamoase, în special în zonele expuse la soare, ceea ce sugerează un efect co-carcinogen al luminii uv. ADN al HPV_5 persistă extracromosomal cu un număr mare de copii în peste 90% din tumori.

Ciclul de multiplicare. În virion, genomul ADN circular, dublu catenar, de 8 kbp, este asociat cu histone de origine celulară (H2a, H2b, H3, H4) şi formează complexe asemănătoare celor de cromatină. Genomul viral este transcris în 8 cadre de citire (ORF), exprimate în molecule de ARN policistronice ce codifică proteine timpurii şi tardive. Cadrele de citire se suprapun. Se sintetizează 5 proteine timpurii şi 3 tardive. Trei dintre proteinele timpurii (E_6, E_7 şi E_5) stimulează celula infectată să intre în faza S. E_6 şi E_7 perturbă controlul trecerii de la G_1 la faza S şi produc imortalizarea keratinocitelor. E6 se leagă cu p53 şi determină degradarea rapidă a acesteia pe calea ubiquitinei. E1 şi E2 controlează replicarea genomului HPV. E_4 interacţionează cu microfilamentele celulei şi determină colapsarea lor. Proteina L_1 este capsidală, iar L_2 are rol în asamblarea virionilor progeni.

La HPV de risc înalt, transcrierea copiilor este iniţiată la doi promotori virali: la cel *timpuriu* se iniţiază transcrierea *mesagerilor timpurii* şi este activ înainte de ciclul infecţios productiv. Pentru ciclul productiv este activat promotorul *tardiv*.

Propagarea HPV *în vitro* nu s-a realizat, deoarece ciclul de multiplicare este condiţionat de programul de diferenţiere al cheratinocitului şi prin natura lor, aceste celule nu cresc *in vitro*.

Papilomavirusurile au un tropism specific pentru celulele epiteliilor squamoase (epitelii cu celule aplatizate), cu rată înaltă de reînnoire, ce constau din *celule stem*[*] nediferenţiate ale stratului bazal al epidermei.

Infecţia celulelor stratului bazal[**] este favorizată de leziunile şi microleziunile epiteliului tegumentar sau se produce la situsurile în care astfel de celule sunt în mod natural expuse la suprafaţă: la joncţiunea diferitelor tipuri de epitelii, ca de exemplu, *zona de tranzit a cervixului uterin* şi la *joncţiunea epiteliului laringian, cu cel respirator*. Receptorul celular pare a fi heparan-sulfatul. Celulele bazale infectate persistă până când sistemul imunitar le elimină sau, în absenţa efectorilor imunitari, câteva decade (fig. 447).

[*] Celula *stem, de origine* sau, *celula mamă* (*stem*, lb. engl. = tulpină) este nediferenţiată, cu potenţialitate înaltă de diviziune şi diferenţiere. Celulele rezultate prin diviziune se diferenţiază gradat şi dobândesc funcţiile tisulare specifice.

[**] Prin diviziunea celulei bazale, *rezultă două celule* cu evoluţie diferită: *una rămâne în stratul bazal* al epidermei şi continuă să se dividă, iar cealaltă intră în *stratul suprabazal*, nu se mai divide şi va fi împinsă spre suprafaţa epidermei, de alte celule fiice, trecând succesiv prin straturile spinos, granular şi cornos.

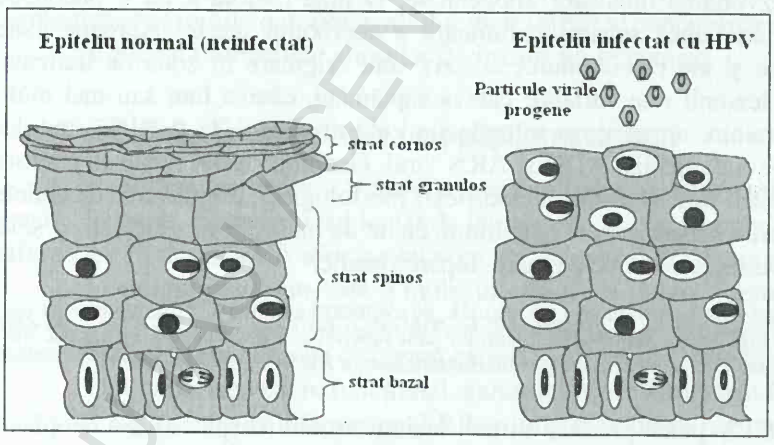


Fig. 447. Diferenţele structurale între epiteliul tegumentar normal (stânga) şi cel infectat cu HPV. În straturile superioare ale epiteliului normal, celulele îşi pierd nucleul, se aplatizează, mor şi se descuamează. Celulele infectate cu HPV ale unui neg rămân nucleate, viabile şi eliberează virioni progeni (după Longworth, 2004).

Latenţa

Celulele stratului bazal al epidermei sunt *nepermisive* şi infecţia este neproductivă. Multiplicarea virusului este complet represată. Genomul viral persistă, în special în stare fizic autonomă. Sunt transcrise într-o măsură limitată, numai *genele programului timpuriu* (E_1 şi E_2) ce catalizează replicarea

genomului. Aceste proteine formează un complex ce se leagă la secvența de origine a replicării ADN şi recrutează ADN-polimeraza celulară şi proteinele accesorii ale replicării. E_1 are şi activitate de *helicază*, permițând separarea catenelor de ADN viral înaintea complexului de replicare.

Genomul viral este păstrat într-un *număr de 20–100 de copii ADN/celulă*, în stare autonomă, rezultate prin replicarea genomului virionului infectant. Numărul de copii este menținut stabil în celulele bazale nediferențiate, tot timpul infecției.

În *celulele stratului bazal*, virusurile papiloma realizează o infecție *latentă* propriu-zisă. Genomul viral persistă, dar nu se sintetizează proteine virale tardive. In absența proteinelor virale, rata diviziunii celulare rămâne în limite fiziologice şi negul nu apare. Celulele stratului bazal pot să poarte mult timp genomul viral, înainte de apariția negului.

Dezvoltarea verucilor

Papilomavirusurile umane sunt agenții cauzatori ai negilor.

Negul poate să apară târziu după infecție, în condiții de imunosupresie sau sub acțiunea unor factori stimulatori ai sintezei proteinelor virale. Proteinele E_6 se asociază cu proteina antioncogenă p53 şi împreună cu ubiquitin-ligaza celulară formează un complex trimeric ce stimulează rata de turn-over a p53. E_7 se leagă cu proteine antioncogene ale familiei Rb. Simultan, proteinele virale stimulează *proliferarea celulelor* stratului bazal şi se formează *o tumoră benignă*. Deoarece celulele stratului se divid, genomul viral se distribuie în celulele fiice, dintre care una se detaşează din stratul bazal, migrează în stratul granular şi se diferențiază (fig. 448).

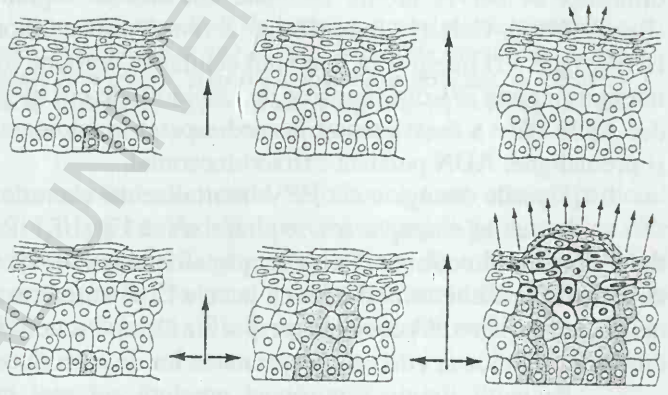


Fig. 448. Reprezentarea schematică a evenimentelor celulare consecutive infecției unei celule a stratului bazal cu HPV. În partea de sus, o celulă infectată se diferențiază fără diviziuni, migrează în straturile superioare, poate produce virus şi poate fi eliminată. În partea de jos sunt reprezentate consecințele obişnuite ale infecției cu HPV: celula stratului bazal, infectată printr-o microleziune, se divide, întârzie procesul de diferențiere, formează un neg şi, eventual, celulele din straturile superioare ale leziunii produc virus (după Zur Hausen, 1994).

Celulele epiteliale normale, după ce părăsesc stratul bazal, ies din ciclul celular şi în straturile suprabazale, *pierd nucleul*, dar *celulele infectate*, după ce părăsesc stratul bazal, rămân active în ciclul celular. Oncoproteinele virale E_6 şi E_7 sunt necesare *imortalizării* cheratinocitelor şi uşurează menținerea copiilor extracromosomale de HPV în celulele bazale nediferențiate şi stimulează celulele diferențiate să reintre în faza S. Sub acțiunea proteinei E_7, celulele diferențiate din straturile suprabazale reintră în faza S şi activează expresia factorilor de diviziune celulară, necesari multiplicării virale. Prezența E_7 duce la menținerea caracterului de *celule nucleate* în toate straturile celulare ale epiteliului infectat (Longworth, 2004).

O funcție majoră a oncoproteinei E_6 la genotipurile cu risc oncogen înalt, este capacitatea de a activa expresia subunității catalitice a telomerazei hTERT*, importantă pentru imortalizarea celulei.

* Vezi capitolul *Noțiuni generale de oncogeneză.*

În cele mai multe tipuri de neoplazii are loc reactivarea expresiei hTERT şi restabilirea activității telomerazei.

E_7 este o oncoproteină formată din circa 100 de aminoacizi. În celulele infectate cu HPV de risc înalt este localizată predominant în nucleu şi se asociază cu proteinele familiei Rb ce cuprinde Rb, p 107 şi p 130. Aceste proteine se exprimă diferențiat în ciclul celular: Rb se exprimă în toate fazele ciclului, p 107 în faza S, iar p 130 predomină în faza G_o.

Al III-lea grup de proteine cu care se asociază E_7 sunt histon-deacetilazele.

Țesutul negului este format din aceleași straturi de celule epiteliale, ca și epiderma, iar membrana bazală este intactă.

Programul multiplicării virale este strâns legat de *procesul de diferențiere* a celulelor epiteliilor squamoase. Există o corelație strânsă între stadiul de *keratinizare* a celulelor epiteliale și exprimarea *programului tardiv* al multiplicării virale. Se sintetizează proteinele L_1 și L_2, care se asamblează spontan în capside icozaedrice.

Virusul nu s-a putut propaga în culturi celulare, datorită dependenței de stadiul de cheratinizare. In straturile celulare profunde ale verucilor nu se găsesc virioni. Celulele negului devin permisive pentru multiplicarea virusului, pe măsură ce se diferențiază în cheratinocite, în straturile *spinos* și *granular*. Virionii se asamblează numai în celulele keratinizate.

După inițierea diferențierii celulare, marcată de începutul cheratinizării, se exprimă atât *genele timpurii*, cât și genele *programului tardiv*. In straturile spinos și granular se sintetizează proteinele capsidei, iar virionii se asamblează în *nucleu*. Particulele virale se eliberează prin descuamarea celulelor de la suprafața leziunii. Leziunile HPV sunt controlate de sistemul imunitar: în 2–3 ani sunt eliminate aproape toate infecțiile cu HPV.

Malignități induse de papilomavirusuri

Un subset al virusurilor papiloma este implicat în apariția *neoplaziile de cervix uterin* și a altor malignități anogenitale, precum și a unor *neoplazii tegumentare* la pacienții cu epidermo-displazie veruciformă. Neoplazia cervicală se dezvoltă lent, în ani sau chiar decade. Circa 99% din biopsiile tumorilor de cervix uterin, recoltate din diferite regiuni ale lumii conțin ADN de HPV_{16} și HPV_{18} (Bosch, 1995). Celulele liniei HeLa (derivată din carcinom de col uterin) conțin ADN HPV_{18}. ADN al HPV_{18} pare a fi integrat în genomul celular în aproape toate tumorile de cervix uterin, iar HPV_{16}, este integrat în circa 2/3 din biopsiile de carcinom de col uterin. Nu pare a fi un situs specific de integrare, dar ADN HPV a fost detectat în mod repetat în vecinătatea protooncogenei *myc*. În leziunile benigne și premaligne, ADN persistă extracromosomal.

Tipurile oncogene de HPV imortalizează cheratinocitele *in vitro*.

În celulele neoplazice se sintetizează E_6 și E_7. Pentru genotipurile de risc oncogen înalt, cele două proteine funcționează ca oncoproteine, capabile să se complexeze cu p53 și cu Rb. Experiențele de transfecție a cheratinocitelor cu genele E_6-E_7, au avut ca rezultat imortalizarea celulelor, cu creștere nelimitată *in vitro*. Comutarea pe poziția "stop" a activității acestor gene a fost urmată de încetarea creșterii celulelor *in vitro* și incapacitatea lor de a produce tumori prin transplantare *in vivo*.

Pacienții imunocompromiși prezintă cel mai mare risc neoplazic, mai ales prin contactul homosexual.

Infecția tractului genital cu HPV determină leziuni *displazice* (pierderea stării de diferențiere a celulelor epiteliale), urmată de neoplazie intraepitelială de cervix gradul I, cu un tablou mediu al dediferențierii. În acest stadiu, numeroase leziuni sunt eliminate de sistemul imunitar în mai puțin de un an, prin mecanisme necunoscute. Unele leziuni nu sunt eliminate de sistemul imunitar și persistă un interval de câteva zeci de ani. Persistența infecției cu HPV de risc carcinogenic înalt este cel mai important factor favorizant al dezvoltării malignităților genitale: carcinom cu celule squamoase sau mai rar, adenocarcinom de cervix (fig. 449). Neoplazia cervicală este pe locul 2 ca frecvență a neoplaziilor și a V-a cauză a morții la femei.

Factorii de risc ai neoplaziei cervicale:

– infecția persistentă cu HPV de risc mare (16, 18, 31, 33, 45);
– număr mare de parteneri sexuali;
– imunosupresia;
– fumatul;
– co-infecția cu virusul imunodeficienței umane.

Papilomavirusurile se *transmit* prin celulele încărcate cu virioni, exfoliate din leziuni. Contactul direct este calea cea mai eficientă de propagare. Virusurile cu tropism genital se transmit prin contact sexual. Din leziunile genitale, virusurile se transmit nou-născutului, în timpul nașterii și pot fi cauza papiloamelor *laringiene* la copii (papilomatoză respiratorie recurentă produsă de HPV_6 și HPV_{11}). Papiloamele laringiene sunt rare, dar creșterea lor obstrucționează laringele și trebuie îndepărtate în mod repetat, pe cale chirurgicală. Tumorile extragenitale au ADN HPV mult mai rar decât cele genitale.

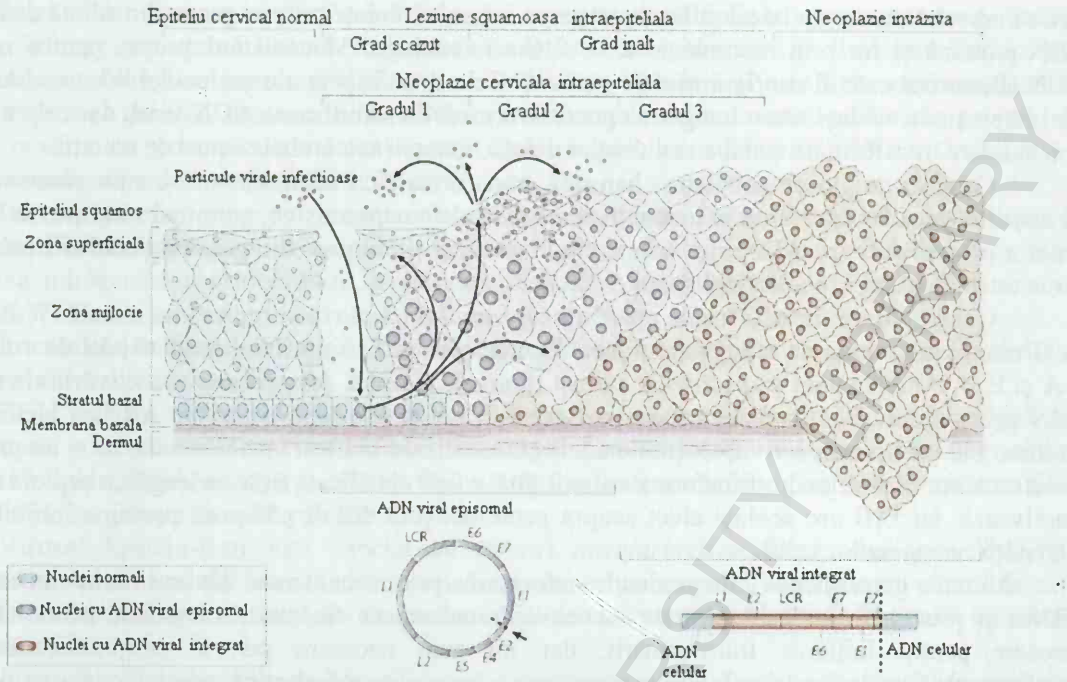


Fig. 449. Evoluția leziunilor epiteliului de cervix uterin infectat cu HPV. În stânga, structura epiteliului normal. Celulele stratului bazal se infectează prin microleziuni epiteliale. În centrul schemei, în celulele suprabazale, ADN viral sub formă episomală, este transcris, se asamblează virus progen, în special în straturile superficiale, iar leziunea rămâne intraepitelială, membrana bazală fiind intactă. In dreapta, ADN viral este integrat în ADN celular, nu se asamblează virus progen, celulele maligne se multiplică invaziv și sparg membrana bazală (după Bosch și colab., 1995).

Rata infecției cu HPV este controlată cu vaccinul *tetravalent*, neinfecțios, care conține particule virus-like alcătuite din proteinele L_1 ale HPV 6, 11, 16 și 18. Vaccinul previne infecțiile persistente cu cele 4 genotipuri de HPV și apariția leziunilor precanceroase. Nu este eficient față de infecția HPV deja stabilită. Se vaccinează fetele adolescente și femeile tinere. Vaccinul a fost administrat din 2006 și nu se anticipează eficiența și durata imunității antivirale, în special în ariile în care circulă alte subtipuri.

23.8.3. Transformarea cu adenovirusuri

Cele peste 50 de serotipuri de adenovirusuri umane formează cel puțin cinci grupe antigenice (A-E). Câteva serotipuri au potențial oncogen: transformă *in vitro* fibroblastele puilor de rozătoare, iar unele dintre acestea, induc tumori la puii nou născuți de șobolan sau hamster (Trentin, 1962).

Serotipurile 12, 18, 31 sunt foarte oncogene pentru puii nou născuți de rozătoare. Adenovirusurile infectează celulele epiteliale diferențiate terminal ale tractului respirator superior, în care precursorii moleculari ai replicării genomului viral sunt în cantități mici. Ele codifică proteine ce stimulează celula să intre în faza S a ciclului celular, creind astfel un mediu favorabil replicării ADN viral (induc sinteza ADN celular, a enzimelor ce catalizează sinteza dezoxiribonucleotidelor, ribonucleotid-reductaza, Tk, ADN-polimeraza, dihidrofolat reductaza) și împiedică celula să sufere apoptoza prematură. Dacă celula este permisivă, infecția este productivă, iar dacă este nepermisivă, inducerea fazei S a ciclului celular este suficientă pentru transformare.

Adenovirusurile umane nu au relații demonstrabile cu neoplazia la om. *In vitro*, celulele de rozătoare sunt semipermisive pentru multiplicarea adenovirusurilor umane. Pentru exprimarea exclusivă a capacității transformante, preparatul viral este mai întâi iradiat, deoarece funcțiile sale litice sunt mai radiosensibile. Frecvența apariției celulelor transformate malign de adenovirusuri crește semnificativ sub acțiunea concomitentă a agenților care activează mecanismele de excizie-reparare, ceea ce sugerează că integrarea ADN viral este stimulată de procesele reparatorii în curs de desfășurare.

Genomul adenovirusurilor este dublu catenar, linear și conține circa 35 kbp. Interacțiunea transformantă implică *integrarea genomului* viral la diferite localizări, în ADN cromosomal al gazdei,

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY CENTRAL

fără să necesite omologia bazelor. Recunoaşterea situsului de integrare ar putea fi mediată de interacţia ADN-proteină şi nu prin recombinarea la situsuri omologe. Mecanismul propus pentru integrarea ADN adenoviral este al *configuraţiei de rachetă*. Cele două capete ale moleculei lineare a ADN viral sunt integrate în acelaşi situs. Integrarea poate fi urmată de stabilizarea ADN viral, dar cele mai multe linii celulare transformate stabil au evidenţiat deleţii, inversii sau ambele tipuri de mutaţii.

Celulele de pui de şobolan şi hamster, transformate cu adenovirusuri conţin *genomuri virale incomplete*, ceea ce denotă că în interacţiunea cu celulele nepermisive, genomul viral pierde o parte a genelor proprii. Alteori, ADN viral este complet excizat şi eliminat din genomul celulei transformate, dar acestea îşi păstrează fenotipul oncogen.

Genele virale transformante aparţin *programului timpuriu* şi reprezintă circa 11% în genom, localizate la extremitatea stângă (regiunea E_1). Regiunea E_1 cuprinde două unităţi de transcriere, E_1A şi E_1B. Ambele sunt transcrise în câteva tipuri de ARNm, prin mecanismul clivării alternative a ARN premesager. Regiunea E_1A este transcrisă în cel puţin două tipuri de ARNm, iar cele două proteine (de 289 şi respectiv 243 aminoacizi) cu localizare nucleară se fosforilează şi au proprietăţi transformante. Rolul lor în transformarea malignă a fost clarificat: E_1A se leagă cu proteina Rb şi o inactivează, iar E_1B are acelaşi efect asupra proteinei p53. Rb şi p53 sunt proteine inhibitoare ale activităţii oncogenelor celulare.

Anumite gene adenovirale produc transformarea prin mecanismul 'hit and run' pentru că ADN, ARNm şi proteinele nu sunt păstrate în celula transformată. Se crede că genele adenovirale sunt necesare pentru iniţierea transformării, dar nu sunt necesare pentru menţinerea fenotipului transformant. Genele virale ar favoriza mutaţia sau instabilitatea genetică prin interacţia cu proteinele celulare. Mecanismul 'hit and run', argumentat *in vitro*, nu este relevant pentru transformarea *in vivo*.

23.8.4. Transformarea cu herpesvirusuri

Toate herpesvirusurile transformă celulele *in vitro*, dar numai γ-herpesvirusurile produc tumori la animalele de laborator.

HSV-2 este agentul etiologic al unei infecţii genitale cronice, ce se transmite pe cale sexuală. Femeile cu neoplazie uterină au o incidenţă mai înaltă a infecţiei şi un titru superior al anticorpilor specifici.

În celulele transformate *in vitro* cu HSV-l sau HSV-2 nu s-au identificat gene transformante, de origne virală. Genele virale se pare că nu sunt necesare pentru menţinerea stării transformate. De aceea, s-a presupus acelaşi mecanism de transformare, ca şi pentru adenovirusuri, denumit "hit and run", ce nu necesită permanenţa genelor virale. Transformarea poate fi consecinţa indirectă a acţiunii mutagene a unei gene virale sau este rezultatul activării unei oncogene celulare. Totuşi, este posibilă prezenţa unui fragment de l–3 kb de ADN viral, ce codifică o funcţie transformantă.

Virusul Epstein-Barr (VEB) a fost descoperit în l964, de către Epstein, în celulele limfomului Burkitt, o tumoră formată din limfocite B. Acest virus infectează cea mai mare parte a populaţiei globului, dar rămâne latent, în special în limfocitele B. In circumstanţe adecvate, VEB poate iniţia proliferarea unor celule: mononucleoza infecţioasă, limfomul Burkitt şi carcinomul nazofaringian. Ultimele două au caracter malign şi apar în anumite zone geografice şi la anumite grupări etnice, ceea ce implică rolul factorilor de mediu şi al celor genetici.

Genomul VEB este o moleculă de ADN dublu catenar, linear, dar se circularizează în celulă, prin legarea secvenţelor terminale repetate. Genomul cuprinde patru regiuni distincte: regiunile *L* (*L*ong) şi *S* (*S*hort) separate prin secvenţele interne repetate invers (IR), iar la capete, secvenţele terminale repetate invers (TR).

VEB are proprietăţi oncogene *in vivo* şi *in vitro*: transformă eficient limfocitele B umane şi ale celorlalte primate *in vitro* şi rezultă *linii celulare stabilizate*, cu creştere indefinită şi tumorigene pentru maimuţe.

Studiile sero-epidemiologice sprijină, dar nu demonstrează cert, ideia că VEB este agentul etiologic al limfomului Burkitt (o tumoră a maxilarului), care apare la copii între 4 şi l5 ani, în ţările Africii tropicale, pe fondul stimulării antigenice cu agentul paludismului. In Uganda, copiii cu titru înalt al Ac anti-proteine capsidale ale VEB au un risc de 30 de ori mai mare de a dezvolta limfomul Burkitt.

În celulele infectate, se desfăşoară fie ciclul complet al multiplicării şi rezultatul este liza, fie are loc o infecţie persistentă latentă. In limfocitele B infectate persistent, în limfomul Burkitt şi în carcinomul nazofaringian, genomul VEB are o conformaţie circulară şi este fizic autonom. Datorită blocării expresiei genelor structurale, în celulele transformate nu se asamblează virus progen, dar exprimă o serie de gene asociate latenţei care codifică proteine nucleare (EBNA1, 2, 3A-3C) şi proteine membranare de latenţă (LMP1, 2).

Factorii genetici au un rol important în dezvoltarea tumorii, ceea ce explică frecvenţa mică a limfomului Burkitt într-o populaţie, în care toţi copiii sunt infectaţi cu agentul malariei şi cu VEB. Activitatea mitogenică a limfocitelor B, datorată stimulării cu antigenele de *Plasmodium* ar uşura infecţia cu VEB.

În celulele limfomului Burkitt, se produce translocaţia unui fragment al cromosomului 8, la unul dintre cromosomii perechilor 14, 2 sau 22.

EBV este un factor de risc pentru producerea *limfomului Hodgkin*. Tumora malignă este caracterizată prin predominanţa infiltratului nemalign, care depăşeşte numărul celulelor maligne (celulele Hodgkin, Reed-Sternberg – HRS). Circa 40% din limfoamele Hodgkin sunt asociate cu EBV: genomul viral se găseşte în toate celulele tumorii.

Virusul Epstein-Barr este asociat cu *tumori nazofaringiene* foarte maligne, de origine epitelială, care apar la adulţi între 20-50 de ani. In aceste celule se poate desfăşura un ciclu litic sau o infecţie latentă transformantă. In ţările temperate, VEB produce mononucleoza infecţioasă, tranzitorie, autovindecabilă.

Virusul bolii Marek. Boala Marek a puilor de găină, este o afecţiune limfoproliferativă şi se manifestă printr-un limfom al limfocitelor T. Virusul infectează latent aceste celule. In *vitro* s-au obţinut linii limfoide T stabilizate şi transformate. Atât *in vivo* cât şi *in vitro*, în celulele transformate, prin tehnicile de hibridare, se detectează 20–130 secvenţe echivalente genomului viral.

Adenocarcinomul renal al broaştei leopard (*Rana pipiens*), descris de Lucke (1934) este produs de un *Herpesvirus*. Virusul izolat din carcinoamele renale, induce tumori la broaştele sănătoase. Adenocarcinomul renal Lucke prezintă două stări naturale, dependente de temperatură. In sezonul cald, celulele tumorale nu conţin virioni. Virusul progen este produs în celulele tumorii, în sezonul rece. Morfogeneza virală este declanşată experimental, prin scăderea temperaturii la +4°C. In sezonul cald, virusul este prezent în celule ca *provirus* şi produce malignizarea. Multiplicarea virusului este termosensibilă. La temperatură scăzută, infecţia are caracterul unui proces litic şi se eliberează virus progen.

Se pare că toate herpesvirusurile conţin informaţie genetică potenţial oncogenă, dar în sistemele permisive, exprimarea sa este mascată de efectul litic. Ca şi în cazul adenovirusurilor, genele funcţiei litice sunt mai radiosensibile decât genele oncogene şi pentru relevarea funcţiei transformante, se recurge la iradierea cu UV a preparatului viral.

23.8.5. Transformarea cu virusul hepatitei B

Virusul hepatitei B (VHB) umane este agentul etiologic posibil al *carcinomului hepatocelular* (CHC), una dintre cele mai maligne neoplazii. Dovezile sunt, în cea mai mare parte, indirecte: riscul de a dezvolta CHC primar este de 223 de ori mai mare la purtătorii de virus decât la nepurtători.

Genomul VHB nu pare să conţină oncogene. Perioada de latenţă, între infecţie şi apariţia tumorii este prea lungă pentru ca hepatocarcinomul primar să fie indus de o oncogenă virală. Rămâne posibilitatea ca o proteină activatoare a protooncogenelor, codificată de *gena x* a VHB să aibă rol în iniţierea procesului de cancerizare.

Virusurile oncogene transformă malign celulele prin integrarea genomului lor în cromosomii celulei. Inserţia secvenţelor virale în vecinătatea oncogenelor celulare perturbă uneori expresia lor şi poate declanşa creşterea necontrolată. Astfel acţionează, după o perioadă de latenţă, retravirusurile netransductoare ce produc leucemii şi carcinoame la păsări şi mamifere.

Pentru desfăşurarea ciclului de multiplicare, VHB nu necesită integrarea genomului său în ADN celular.

Genomul VHB se găseşte integrat în unul dintre cromosomii hepatocarcinomului la purtătorii cronici ai hepatitei B, dar uneori şi în tumorile pacienţilor fără Ag HBs seric. De asemenea, ADN al

VHB se găseşte integrat în hepatocitele unor purtători cronici de VHB. De aceea se crede că ADN al VHB se integrează înainte de transformarea malignă.

Analiza moleculară relevă că ADN viral se inseră în cromosomii umani la situsuri diferite. Inserţia determină apariţia rearanjărilor genetice (deleţii, translocaţii, amplificări). Aceste anomalii sunt frecvente în tumorile umane. Integrarea nu pare să aibă loc în domeniile genomice ale protooncogenelor şi nici nu alterează expresia lor funcţională.

ADN al VHB s-a detectat, în stare integrată, în gena ce codifică receptorul pentru acidul retinoic (derivat al vitaminei A), cu rol în diferenţierea şi proliferarea celulară (Dejean, 1991).

Gena virală x codifică sinteza unei proteine (x) care, deşi nu interacţionează direct cu ADN celular, are rolul de factor activator al transcrierii genelor virale şi celulare, inclusiv al genelor N-myc şi NF-kB.

În circa 30% dintre hepatoame, gena p53 este mutantă, mai ales la cei intoxicaţi cronic cu aflatoxine mutagene. Proteina x, probabil interferă cu mecanismele reparatorii ale ADN, care poate să crească rata mutaţiei p53.

La marmotă (*Marmota monax*), ADN al virusului hepatitei este integrat în ADN al celulelor tumorale. In 30% din cazuri, genomul viral se integrează în vecinătatea oncogenelor celulare *myc*, cu rol în creşterea şi diferenţierea celulară. O parte a genomului viral se inseră lângă *oncogena myc*, fără să altereze informaţia ei. Dar, proteina *Myc* este sintetizată în exces şi stimulează creşterea celulară necontrolată. Mecanismul acţiunii ei este identic cu acela al retravirusurilor oncogene netransductoare.

Un alt factor mutagen cu rol în evoluţia hepatitei cronice îl constituie oxidanţii ($^1O_2$, peroxidul, radicalii superoxid (O_2^-) şi hidroxil ($OH^{\cdot}$), generaţi de celulele fagocitare în focarul inflamaţiei cronice a ficatului. Oxidanţii determină ruperi monocatenare ale ADN sau activează exprimarea unor protooncogene. Pe aceiaşi cale produc leziunile hepatocelulare cronice, factorii nevirali: consumul cronic de alcool. Hepatita cronică alcoolică evoluează spre ciroză, ca şi cea cronică virală.

Bibliografie

Roman A. 1989. Human *Papillomaviruses*: are we ready to type ? Clin. Microbiol. Rev. 2, 166–190.

Longworth M. S., Laimins L. A. 2004. Pathogenesis of Human *Papilloma* Viruses in Differentiating Epithelia. MMBR 68, 2, pp. 362–372.

Bosch X., Manos M. M., Munoz N., Sherman M., Jansen A. M., Peto J., Schiffman M., Moreno V., Kurman R., Shan K. V. 1995. Prevalence of Human *Papilloma* virus in Cervical Cancer: a Worldwide Perspective. J. for Nat. Cancer Institute 87 (11), pp. 796–802.

Christopher P. C., Barber S., James R. K. 1991. Pathobiology of Papillomavirus-Related Cervical Diseases. Prospects for Immunodiagnosis. Clin. Microbiol. Rev. vol. 4, no. 3, pp. 270–285.

Orth G. 2008. *Papillomaviruses*: General Features of Human Viruses, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W. J. Mahy, Marc H. V. Van Regenmortel, AP.

Major E. O., Amemiya K., Tornatore C. S., Houff S. A., Berger J. R. 1992. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain – Clin. Microbiol. Rev. 5: 49–73.

Cole C. N. 1996. Polyomavirinae: The Viruses and Their Replication, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Press, Philadelphia.

Howley P. M. 1990. Papillomavirinae and Their Replication, în vol. Virology, Second Ed., edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, New York.

Zur Hausen, H. 1989. *Papilloma* Viruses as Carcinoma Viruses – Advances in Viral Oncology, vol. 8, edited by G. Klein, Raven Press, Ltd, New York.

Zur Hausen H., De Villiers E.M. 1994. Human *Papillomaviruses* – Annu. Rev. Microbiol. 48: 427–447.

Shah K. V., Howley P. M. 1996. *Papillomaviruses*, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Press, Philadelphia.

Shah K. V., Howley P. M. 1990. *Papillomaviruses*, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York

Mişcalencu D., Mailat F., Mihăescu Gr. 1981. Viral particles in the hepatocytes of *Rana aesculenta* (L). Rev. Roum. Med. (Virol.), 32, 2, 123–128.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

24. AGENŢI INFECŢIOŞI SUBVIRALI

Ideia că virusurile ar reprezenta cel mai simplu tip de agenți infectioşi a fost infirmată de evidențierea în ultimele decenii, a unor agenți subvirali, patogeni pentru plante, om şi animale, care produc boli grave, mortalitate şi mari pagube economice.

24.1. Virusul hepatitei D

Virusul hepatitei D (*HDV*) este clasificat ca un virus satelit, deoarece în ciclul multiplicării sale, HBV este un helper esențial. Din această cauză, infecția cu virusul hepatitei D este asociată, în mod obligatoriu, cu virusul hepatitei B şi cu antigenul HBs.

VHD a fost descoperit în '77, de către o echipă care studia biopsiile hepatice de la pacienții pozitivi pentru HBs. Anticorpii marcați cu fluoresceină, purificați de la un pacient pozitiv pentru Ag HBs şi HBc, reacționează nu numai cu Ag HBc din hepatocitele aceluiaşi pacient, ci şi cu țesutul hepatic obținut prin biopsie de la pacienții cu hepatită B, *negativi pentru Ag HBc.*

Noul Ag din hepatocitele negative pentru HBc s-a numit *Ag D.*

Ag D se aseamănă cu *Ag HBc*, în primul rând din punct de vedere serologic: dau reacție încrucişată, adică ambele reacționează cu Ac specifici față de unul dintre ele.

Distribuția tisulară a celor 2 Ag este aceiaşi: *Ag D este asociat în mod obligatoriu cu VHB şi cu Ag HBs, dar rareori coexistă cu Ag HBc.*

5% dintre pacienții cu hepatită B sunt pozitivi pentru Ag D. Ag D nu se găseşte niciodată la pacienții cu hepatita non-B.

VHD nu a fost clasificat. Se aseamănă mai mult cu virusurile satelite ale plantelor, deoarece necesită funcția helper a unui virus neînrudit. Ca şi la virusurile satelite, genomul HDV conține o secvență codificatoare pentru o singură *proteină structurală.*

Din punct de vedere structural, preparatele de HDV colorate negativ, sunt heterogene ca dimensiuni, cu diametrul mediu de 36 nm (26–39 nm).

HDV are ca genom o moleculă de *ARN mc circulară* închisă covalent, asociată *cu două variante biochimice* ale proteinei structurale ce constituie AgHD. Impreună formează o nucleocapsidă incompletă (fig. 450).

Nucleocapsida este învelită de Ag HBs, codificat de VHB. Învelişul HDV are caracteristicile fizice şi antigenice ale virusului helper.

Genomul ARN al HDV este alcătuit din 1679–1683 nt. Este cel mai mic genom dintre cele cunoscute pentru virusurile infecțioase pentru animale.

La EF în gel de PAA s-au identificat două variante de ARN – cu conformație *lineară* şi *circulară*, variante ale aceleiaşi molecule. Forma *circulară închisă covalent* reprezintă molecula nativă. 70% dintre baze sunt complementare şi formează o structură alungită, în esență dublu catenară.

Multiplicarea. VHD nu a fost cultivat nici în liniile celulare hepatice care conțin ADN al VHB integrat. Aceste linii nu pot fi infectate nici cu VHB. Faptul reflectă, probabil, pierderea receptorilor membranari prin intermediul cărora cele două virusuri se fixează pe membrana hepatocitului.

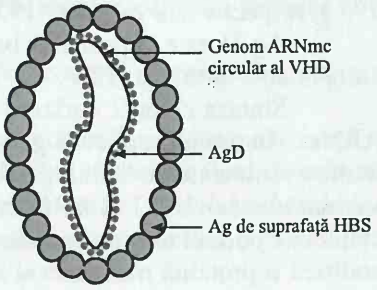


Fig. 450. Reprezentarea schematică a structurii virusului hepatitei D (VHD). Genomul circular mono-catenar este asociat cu antigenul D (proteina D) codificat de virus. Învelişul viral este asamblat din proteina HBs, codificată de virusul hepatitei B.

ROMANIAN UNIVERSITY LIBRARY

Spectrul de gazdă al VHD este limitat la speciile permisive pentru multiplicarea unui hepadnavirus, capabil să furnizeze funcţia helper pentru asamblarea VHD: cimpanzeul, sensibil la infecţia cu VHB, *Marmota monax,* raţa de Pekin.

La cimpanzeu, co-infecţia experimentală cu HDV şi HBV poate să producă o hepatită moderată până la severă, cu exprimarea simultană a Ag D şi HBc în hepatocite. Simultan se sintetizează Ac anti-HD şi anti-HBc.

Mecanismele de fixare, pătrundere în celulă şi dezvelire nu se cunosc.

Replicarea genomului. Genomul virusului hepatitei D, este o moleculă de ARN monocatenar, circulară, covalent închisă, formată din 1679–1683 de baze (1,7 kb), de *polaritate negativă.* Molecula se pliază şi bazele complementare se împerechează în proporţie de 70%, formând o structură de formă alungită neramificată. Replicarea genomului este dependentă de ARN-pol, are loc în nucleu şi este catalizată de ARN-pol II a celulei. Molecula genomică funcţionează ca matriţă pentru transcrierea unei catene multimerice antigenomice, după modelul cercului rotativ. Pentru iniţierea transcrierii este necesară clivarea moleculei circulare. O secvenţă genomică de 85 nucleotide a ARN genomic şi antigenomic, funcţionează ca o enzimă de autoclivaj, ca o ribozimă cu situs unic de acţiune (ARN are funcţie *ribozimică*). Clivarea şi ligarea ARN se produc în absenţa proteinelor enzimatice*. Molecula de ARN are activitate *enzimatică ribozimică.*

* În celulă, clivarea moleculelor de ARN, excizia intronilor şi înnădirea exonilor sunt catalizate de proteine enzimatice.

În celulele hepatice se găsesc molecule de ARN de diferite dimensiuni, cu polaritate genomică sau antigenomică, dintre care unele sunt multimeri ai genomului de 1,7 kb. Raportul moleculelor genomice/antigenomice variază între 5–30/1. Majoritatea moleculelor genomice sunt mc, iar cele antigenomice sunt complexate cu catene genomice, prin complementaritatea bazelor. Variatele forme de ARN în nucleul hepatocitelor sunt în acord cu replicarea după *mecanismul cercului rotativ*, ca şi ARN viroidal (vezi replicarea ARN viroidal).

Moleculele *circulare* de polaritate genomică au rol de matriţe pentru sinteza moleculelor *multimere lineare* complementare, iar acestea sunt copiate în molecule multimere lineare de polaritate genomică.

Moleculele multimere, cu polaritate genomică, sunt clivate la situs specific. Clivarea este autocatalitică şi rezultă molecule monomere. Legarea extremităţilor generează molecule închise covalent.

Copierea matriţei genomice, dar şi a catenei lineare multimere antigenomice este catalizată, probabil, de *ARN-polimeraza II* a celulei, care "greşeşte" matriţa ei naturală (molecula de ADN).

Genomul se poate replica şi în celule nehepatice, în absenţa VHB. Ag D nu are rol în replicare, ci numai în stabilizarea ARN genomic pentru împachetare.

24.1.1. Proteine codificate de virus

ARN antigenomic este tradus în Ag D şi are probabil rol de matriţă pentru sinteza ARN genomic.

În serul şi în mojaratul hepatic de la pacienţii cu HDV se găsesc 2 Ag foarte asemănătoare: *195* şi respectiv *214 aac.* Cei 195 aac sunt aceiaşi pentru ambele forme.

Ag D este o proteină bazică fosforilată şi se acumulează în nucleii celulelor infectate. Este componenta internă a HDV.

Sinteza celor 2 variante este rezultatul unui proces de modificare post-transcriere (editing) a ARNm: în timpul replicării genomului, o fracţie a copiilor de ARN antigenomic, suferă unul sau mai multe evenimente de "editing" post-transcriere. Unul dintre ele este esenţial: *A* din mijlocul codonului terminal *amber* UAG al ARN codificator al *Ag D de 195 aminoacizi*, este dezaminată de o enzimă a celulei*. Codonul terminal *amber* este înlocuit cu codonul (UIG) pentru sinteza Trp. ARNm modificat, codifică o proteină mai mare – *antigenul D de 214 aminoacizi*, o proteină bazică, fosforilată care se acumulează în nucleul celulei infectate.

* Dezaminarea *A* are importanţă biologică majoră. Conversia *A* la *I* (*Inozină*) modifică mesajul ARN, deoarece *I* este recunoscută ca *G* (nu ca A). Molecula de ARN astfel modificată este tradusă într-o proteină a cărei secvenţă de aminoacizi diferă faţă de a proteinei native.

Antigenul mic se sintetizează timpuriu, este reglator şi are efect stimulator asupra replicării genomului.

Antigenul mare este sintetizat mai târziu în infecție, este inhibitor al replicării genomului, dar este esențial pentru asamblarea particulei de HDV. Antigenul mare favorizează interacția HDV cu proteinele de înveliș ale HBV și este un represor al multiplicării HDV. Dacă sinteza proteică nu se comută de la varianta mică la varianta mare, infecția acută poate să progreseze la o hepatită fulminantă.

Epidemiologie. Se presupune existența a două modalități de infecție: infecția concomitentă cu HBV și HDV, hepatita fiind mai severă; suprainfecția pacienților HBV cu virusul δ. În absența Ag HBs, virusul δ este multiplicat, dar nu se disemineză de la o celulă la alta.

Patologie. Infecția cu virusul δ produce hepatita acută și cronică, numai în prezența VHB. ECP al VHD pare a fi preponderent față de efectele imunoreactivității spre deosebire de alte hepatite virale, la care leziunile celulare sunt consecința, în primul rând a reactivității imunitare.

Ficatul este singurul organ implicat, cu necroză celulară și inflamație, ca și în alte hepatite virale distructive, dar hepatita D este mai severă. Celulele inflamatorii – limfocite și macrofage, sunt foarte evidente în parenchim.

Perioada de incubație este de 3–7 săptămâni. Urmează faza preictercă, cu simptome nespecifice (3–7 zile). Cresc valorile ALT (alanin-aminotransferaza) și AST (aspartat-aminotransferaza).

Faza icterică, dacă apare, se caracterizează prin urină de culoare închisă (brună) și colorarea tegumentului. În unele cazuri, hepatita severă, considerată ca fiind produsă de HBV este de fapt rezultatul infecției concomitente cu VHD.

Pentru *diagnosticul* HDV se folosesc teste pentru detectarea Ac anti-HD (IgG și IgM) și pentru detectarea Ag HD și a ARN VHD. În biopsiile de ficat, prin metoda IF sau a imunoperoxidazei se evidențiază Ag D.

Bibliografie

Taylor J. M. 1996. Hepatitis Delta Virus and Its Replication, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.

Taylor J. M. 1992.The Structure and Replication of Hepatitis Delta Virus. Annu. Rev. Microbiol. 46: 253–276.

Purcell R. H., Gerin J.L. 1990. Hepatitis Delta Virus, în vol. Virology, sec. ed., ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Polish L. B., Gallagher M., Fields H. A., Hadler S. C. 1993. Delta Hepatitis: Molecular Biology and Clinical and Epidemiological Features – Clinical Microbiology Reviews. vol. 6, no. 3.

Sureau C., Guerra B., Lee H. 1994. The Middle Hepatitis B Virus Envelope Protein is not Necessary for Infectivity of Hepatitis Delta Virus – Journal of Virology. vol. 68, no. 6, pp. 4063–4066.

Howard C. R., Zuckerman A. J. 1990. Viral Hepatitis, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

24.2. Viroizii

Viroizii reprezintă o categorie specifică de agenți infecțioși subvirali, patogeni exclusiv pentru plante, caracterizați printr-un genom alcătuit din ARN pur, prin absența capsidei proteice și a stadiului de virion.

Denumirea de "viroid" (cu aspect de virus) este neadecvată, deoarece genomul lor nu este niciodată protejat de un înveliș proteic.

Viroizii s-au descoperit accidental (Diener, 1971), cu ocazia încercărilor de caracterizare a agentului patogen al bolii tuberculilor fusiformi la cartof, considerată până atunci ca fiind de origine virală. Viroizii cunoscuți în prezent au luat numele maladiei pe care o produc: *viroidul tuberculilor fusiformi la cartof, al nanismului și marmorării clorotice a crizantemelor, al nanismului la hamei* etc. Cel mai studiat este viroidul, care produce boala tuberculilor fusiformi la cartof.

Morfologie și structură moleculară. Viroizii sunt molecule de ARN pur. La microscopul electronic, ei apar sub forma unor structuri lineare, ca niște bastonașe, ușor curbate, lungi de circa 50 nm, cu o grosime de 2,0–2,5 nm, izolate sau grupate în agregate compacte. Greutatea lor moleculară este cuprinsă între 75–125 kDa.

Structura moleculară a viroidului care produce boala tuberculilor fusiformi la cartof, este cu totul neobișnuită, fiind reprezentată de molecule de ARN mononatenar, circulare, închise covalent, alcătuite din *359 ribonucleotide*, a căror structură primară (secvență) a fost determinată cu exactitate.

Structura secundară, de dublă helice defectivă, este de asemenea foarte caracteristică. Datorită gradului ridicat de complementaritate intramoleculară, un număr mare de baze (244, respectiv 68%) sunt legate în perechi. Ele formează regiuni dublu catenare (rezultate din împerecherea intracatenară a unei secvențe de 4–5 baze), care alternează cu regiuni mai scurte monocatenare (2–3 baze), sub forma unor bucle interne şi terminale, corespunzătoare regiunilor lipsite de baze complementare, care rămân separate. Acest tip de structură, numită "în ac de păr", impune anumite constrângeri topologice, datorită cărora molecula de ARN suferă o pliere tridimensională. După denaturare cu formaldehidă, la 63°, legăturile de H dintre bazele complementare se rup şi la microscopul electronic se observă molecule circulare monocatenare cu lungimea de 140 nm şi molecule lineare monocatenare cu lungimea medie de 110 nm.

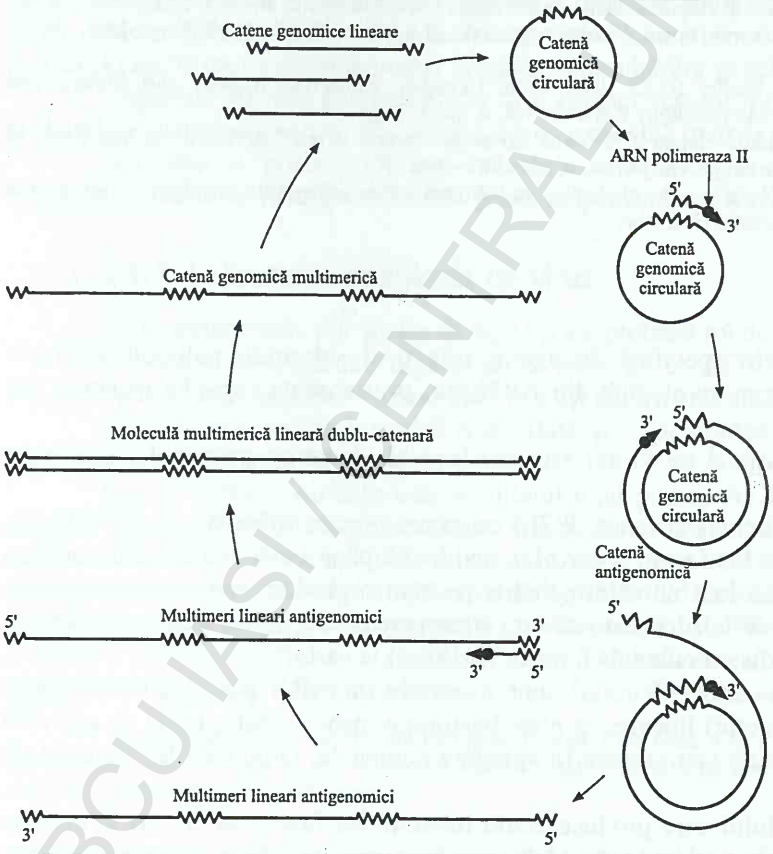
Datorită dimensiunilor mici, viroizii au rezistență deosebită la agenții fizici (radiații) şi chimici.

Mecanismul replicării ARN viroidal nu este cunoscut. Cantitatea de informație genetică a ARN viroidal este foarte mică (teoretic suficientă numai pentru a codifica o proteină alcătuită din 119 aminoacizi). Experiențele cu extracte acelulare de plante şi bacterii au evidențiat că ARN viroidal nu are capacitatea de codificare, datorită absenței situsurilor de legare ribosomală (absența *codonului initiator AUG*) şi datorită structurii secundare stabile şi circularității moleculei. ARN viroidal nu funcționează ca ARNm. Absența capacității de codificare a ARN viroidal este confirmată de faptul că din celulele vegetale infectate nu s-a purificat nici o proteină străină de proteinele plantei, care să sugereze originea viroidală.

Replicarea viroizilor este, în consecință, total dependentă de celulă, reprezentând o formă aparte de parazitism absolut, distinctă de tipul celei descrise pentru virusuri.

Au fost propuse mai multe modele ipotetice, bazate pe cunoştiințele actuale de biologie moleculară, implicând activitatea unor enzime diferite.

Modelul lui Branch şi *Robertson* (1984) este cel mai probabil, deoarece se bazează pe evidențierea concomitentă, în celulele infectate, a două tipuri de molecule de ARN, respectiv, molecule tipice de *ARN viroidal circulare* (notate convențional "+") şi molecule de *ARN multimere lineare*, cu o secvență complementară (notate "–").



Fg. 451. Modelul replicării ipotetice a viroizilor după mecanismul cercului rotativ.

Modelul consideră că moleculele multimere de ARNc sunt *intermediari de replicare*, iar forma circulară a viroizilor maturi, sugerează că replicarea s-ar face prin *mecanismul cercului rotativ* (fig. 451), sub controlul *ARN-polimerazei II celulare*, a cărei legare de extremitățile viroizilor a fost evidențiată prin microscopie electronică. Rezultă molecule lineare multimere de sens antigenomic. Acestea sunt transcrise în molecule multimere complementare de *sens genomic,* ulterior prelucrate prin clivaj la situs specific. După legarea extremităților se formează molecule circulare mature. În mod surprinzător, activitățile enzimatice de clivare şi legare a extremităților, se desfăşoară în absența proteinelor enzimatice şi se aseamănă cu mecanismul autoexciziei intronilor din ARN premesager al organitelor. ARN are activitate enzimatică – *ribozimică.*

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Deoarece, în mod normal, ARN-polimeraza II celulară foloseşte ca matriţă o molecula de ADN, autorii consideră că, datorită structurii lor unice, prezenţa viroizilor în celule ar fi interpretată greşit de enzimă, ca o moleculă de ADN. După aceşti autori, viroizii ar fi agenţi similari ADN (ADN-like).

După alţi autori, replicarea moleculei de ARN viroidal este *autocatalitică*. O moleculă de ARN care se replică autocatalitic se numeşte *ARN-replicază*.

Replicarea viroizilor are loc în nucleul celulelor şi, ca urmare, infecţiozitatea maximă este asociată cu nucleul şi, în special, cu cromatina celulelor infectate.

În funcţie de faza infecţiei, numărul viroizilor variază între 200 şi 10.000/celulă.

24.2.1. Patogenitatea viroizilor

Deşi cantitatea de informaţie genetică pe care o aduc în celulă este foarte mică, viroizii produc mai mult de l0 maladii grave ale plantelor de cultură sau ornamentale, cu importanţă economică. Între acestea, cele mai studiate sunt: boala tuberculilor fusiformi la cartof, nanismul şi marmorarea clorotică a crizantemelor, nanismul hameiului, boala cadang-cadang a cocotierului şi o boală caracteristică a portocalilor şi lămâilor, însoţită de distrugerea progresivă a scoarţei şi scăderea masivă a producţiei de fructe.

Infecţia experimentală reproduce tabloul manifestărilor patologice la plante din aceiaşi specie, datorită replicării excesive a acestor entităţi moleculare cu caracter infecţios. ARN viroidal care produce boala tuberculilor fusiformi la cartof, se propagă la un număr foarte mare de plante din familia *Solanaceae*, dar şi la plante din alte familii, unde se replică fără să producă simptomele îmbolnăvirii.

Viroizii produc infecţii persistente: la cartof, simptomele apar în perioada formării tuberculilor, iar la tomate, la 2–3 săptămâni de la infecţie. În frunzele de tomate şi în peţiol, după infecţia cu ARN viroidal al tuberculilor fusiformi de cartof, se produce o hipertrofie marcată a nucleului şi se intensifică curenţii citoplasmatici. În ţesutul infectat, infecţiozitatea este asociată cu fracţia sa nucleară, ceea ce denotă că ARN viroidal este asociat cu nucleul şi în special cu cromatina celulelor.

Mecanismul producerii bolilor viroidale este greu explicabil, deoarece ARN viroidal nu codifică sinteza unor proteine noi. Ţesuturile plantelor infectate nu conţin proteine noi, în raport cu plantele sănătoase, dar prezintă variaţii cantitative foarte importante ale unor proteine normale. Este probabil că viroizii determină o perturbare a mecanismelor de reglare a exprimării anumitor gene ale celulei. Viroizii nu ar acţiona prin exprimarea propriei lor informaţii genetice, ci prin perturbarea funcţiei genelor celulare, a cărei consecinţă ar fi alterarea mecanismelor normale de reglare a funcţiilor celulei.

Viroizii posedă secvenţe complementare faţă de ARN 7S al celulei: ARN 7S împreună cu un set de 6 proteine formează un complex ce controlează inserţia posttraducere a proteinelor în membrană. Genomul viroidal poate să interfere antisens cu ARN cu ARN 7S şi astfel, indirect, cu formarea membranei.

În unele cazuri, s-a observat o scădere pronunţată a cantităţii de gibereline în ţesuturile plantelor infectate. Deoarece acidul giberelic poate regla evenimentele nucleare ale transcrierii, precum şi metabolismul unor specii de ARN, replicarea viroizilor şi/sau patogenitatea lor ar putea fi influenţate prin intermediul acestei clase de mediatori hormonali.

Tulburările de creştere, frecvent asociate cu infecţiile viroidale, pot fi astfel explicate ca rezultat al unui dezechilibru al sintezei şi activităţii hormonilor de creştere: viroizii prezenţi în nucleul celulelor, ar acţiona ca molecule anormale de reglare, care interferă cu cele care asigură în mod normal reglarea genelor ce codifică hormonii de creştere.

Transmiterea viroizilor pe orizontală, de la o plantă bolnavă, la plantele sănătoase se realizează în mod obişnuit, pe cale mecanică (de exemplu, prin altoire sau prin alte leziuni mecanice), probabil prin intermediul nucleilor celulari sau al unor fragmente de cromatină, care conţin ADN viroidal. Conservarea infecţiozităţii viroizilor în cursul transmiterii, în fazele extracelulare, adică păstrarea infecţioziăţţii lor în absenţa învelişului proteic (capsidal) este datorată localizării lor intranucleare, la adăpost de atacul enzimatic.

BUASVM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Transmiterea viroizilor pe verticală, se face prin polenul infectat al plantelor de tomate sau cartof.

Originea viroizilor este necunoscută. Au fost propuse mai multe ipoteze.

1. *Ipoteza originii virale* a fost formulată în două variante:

a) Viroizii ar fi entități virale foarte primitive, care nu au ajuns la gradul de complexitate structurală şi genetică, necesare pentru a induce în celulă, reacțiile metabolice noi, de biosinteză, pentru a codifica sinteza proteinelor specifice, capabile să asigure propria lor replicare;

b) Viroizii ar reprezenta entități virale degenerate, a căror biosinteză şi replicare a fost inițial determinată de infecția cu ARN viral, care a suferit o reducere importantă a genomului (inclusiv a genelor care codifică proteinele capsidei) şi a căpătat o autonomie totală.

2. *Ipoteza originii celulare* consideră viroizii ca provenind din acizii nucleici ai celulei:

a) Viroizii ar putea proveni din *transcrierea unor gene cromosomale* patologice, sub influența unor factori încă nedeterminați, sau ar fi derivați dintr-o specie de ARN cu gr. mol. mică, de genul celor prezente în nucleu şi nucleol, implicate în mod normal în reglarea unor funcții nucleare şi în transcrierea ARN;

b) *Viroizii ca derivați ai elementelor genetice transpozabile (EGT)*. Ipoteza se bazează pe observația că viroizii conțin secvențe care se aseamănă cu cele prezente la extremitățile EGT. Viroizii ar fi evoluat din EGT sau din provirusuri retravirale, din care, în cursul transcrierii la ARN, ar fi dispărut unele secvențe de baze;

c) Ipoteza originii viroizilor prin *circularizarea intronilor*, se bazează pe faptul ca genele celulelor eucariote, ca şi cele ale virusurilor animale, au o structură discontinuă, în sensul că sunt formate din secvențe cu rol de codificare (exoni), care prin transcriere sunt regăsite în structura ARN matur şi secvențe intercalate (introni), care sunt clivate în etapa de prelucrare a ARN premesager.

În cursul procesului de biosinteză a proteinelor, întreaga genă (exonii şi intronii) este transcrisă la o moleculă mare de ARN premesager. Ulterior, acesta suferă un proces de maturare, prin care intronii sunt îndepărtați de o enzimă specială, iar exonii sunt "lipiți" sau înnădiți cap la cap, pentru a forma o moleculă de ARN matur, care trece în citoplasmă şi este tradusă într-o secvență polipeptidică.

Secționarea intronilor este controlată de o moleculă mică de ARN ($ARN\ U_1$), prezentă în nucleii celulelor vegetale, parțial omolog cu intronii, care se leagă de extremitățile acestora, asigurând excizia corectă. Final, intronii se circularizează sub controlul unei ARN-ligaze. Circularizarea împiedică degradarea enzimatică, conferă posibilitatea de replicare necontrolată şi de infecțiozitate, prin mobilitate intercelulară şi între organisme.

24.3. Virusoizii

Virusoizii sunt o clasă particulară de ARN satelite în celulele plantelor infectate cu virusuri, descoperite în 1983. Sunt molecule mici de ARN monocatenar încorporate în *stare fizic autonomă* (ARN_2), în capsida unor virusuri fitopatogene cu genom segmentat sau *integrate* în genomul viral (ARN_1).

Virusoizii sunt totdeauna dependenți de virusuri helper şi sunt încapsidate de o proteină de înveliş a virusului helper.

Moleculele de ARN satelite pot fi :

– mai mari de 500 nucleotide;

– mai mici de 500 nucleotide, unele lineare, iar altele circulare (asemănătoare viroizilor).

Moleculele mari de ARN pot să codifice proteine. Replicarea moleculei de ARN genomic este catalizată de ARN-polimeraza virusului helper sau de ARN-polimeraza dependentă de ARN a celulei vegetale. Activitatea ARN-polimerazei dependentă de ARN, detectabilă în multe tipuri de celule vegetale neinfectate, se intensifică după infecția virală şi nu are specificitate de virus, în timp ce ARN-polimerazele virale sunt specifice. Virusoizii nu se multiplică în absența virusului helper, fie datorită absenței replicazei, fie datorită absenței proteinelor capsidale.

ARN satelit, asemănător celui viroidal, are domenii *ribozimice*. Ribozimele au rol în replicare. S-a presupus că ARN satelit viroid-like are origine filogenetică comună cu viroizii.

Virusul hepatitei D are proprietăți asemănătoare cu ARN viroidal: este circular, dependent de un virus helper şi are activitate ribozimică.

Virusoizii VTMV (*Velvet tobacco mottle virus*), care produce o formă specială de marmorare la plantele de tutun, ca şi cel care produce marmorarea unor plante tropicale (*Solanum nodiflorum mottled virus*), sunt integraţi în genomul viral, prezenţa lor asociată fiind obligatorie pentru producerea infecţiei.

Virusoizii se deosebesc de viroizi, prin faptul că genomul lor este încapsidat şi este incapabil să infecteze plantele sensibile, în absenţa genomului viral asociat.

Bibliografie

Roossinck M. J., Sleat D., Palukaitis P. 1992. Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. Microbiol. Rev. 56(2): 265–279.

Creighton T. C. 1999. Encyclopedia of Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.

24.4. Virino

Sub această denumire a fost descris un agent infecţios subviral, alcătuit dintr-o moleculă mică de acid nucleic, asociat cu o proteină codificată de celula gazdă. Acidul nucleic nu codifică sinteza unor proteine, dar are rol de matriţă pentru propria sa replicare, catalizată de enzimele celulei gazdă. El are, probabil, un rol de reglare a activităţii celulelor infectate, declanşând sinteza unor proteine codificate de celula gazdă.

24.5. Prionii

Prionii formează o categorie specială de agenţi infectioşi subvirali, patogeni pentru om şi animale, alcătuiţi exclusiv dintr-o *moleculă proteică*. Sunt lipsiţi de genom şi, în consecinţă, diferă de toate celelalte categorii de agenţi infectioşi prezenţi în natură, prin faptul că nu conţin nici-un tip de acid nucleic (nici ADN, nici ARN).

Conceptul de *prion* (*pr*oteinaceous *i*nfectious) a fost definit de Prusiner (1982), după circa 20 de ani de studii asupra bolii *scrapie*. Denumirea reflectă unul dintre simptomele sale majore, respectiv pruritul (*to scrapie*, lb.engleză = a freca, a răzui, a curăţi răzuind lâna). Studiile asupra bolii *scrapie*, semnalată încă din secolul XVIII în Marea Britanie au incriminat, în ultimele 5 decenii, peste 20 de tipuri de agenţi patogeni, incluzând virusuri, viroizi, protozoare, macromolecule replicative etc.

Prionii sunt alcătuiţi dintr-o *glicoproteină hidrofobă*, cu gr. mol. de 28 kDa, extrem de rezistentă la degradarea cu proteaze, la formol 10% (timp de 28 de luni) şi la căldură (fierbere timp de trei ore), precum şi la toţi agenţii inactivatori ai acizilor nucleici.

Prin analogie cu nomenclatura proteinelor din Virologie (*VP – Viral Protein*), această proteină infecţioasă şi patogenă a fost denumită *proteina rezistentă la proteaze* (*PrP*, Prusiner, 1983; Mc Kinley, 1983).

Maladiile prionice constituie un grup de afecţiuni neurodegenerative, reprezentate la om de maladia Creutzfeldt-Jakob (MCJ), kuru, sindromul Gerstmann-Straussler Scheinker (GSS), insomnia familială fatală (IFF), de encefalopatia spongiformă a bovinelor* (boala vacilor nebune) (ESB) şi felinelor, maladia scrapie (tramblanţa) a ovinelor şi caprinelor, encefalopatia nurcilor, maladia epuizării cronice a rumegătoarelor sălbatice. Aceste maladii se caracterizează prin acumularea unei proteine, denumită PrP^{sc}, ce corespunde unei *forme alterate a proteinei normale* PrP^{c}.

Creierul persoanelor sau animalelor atinse de encefalopatia spongiformă are aspect spongios. Maladiile prionice sunt transmisibile de la organismul bolnav la cel sănătos al aceleiaşi specii sau al unor specii diferite.

* Encefalopatia spongioasă transmisibilă (EST) a fost adusă în prim planul actualităţii în 1996, după ce medicii veterinari englezi au relevat posibilitatea transmiterii ei la om. Epidemia ESB a atins apogeul în anii '92–'93, în Anglia, cu 3500 de noi cazuri declarate lunar. A fost incriminată alimentaţia bovinelor: fabricile de furaje proteice au introdus făini de origine animală (carcase de ovine şi bovine). Modificarea procedeului tehnic a survenit în anii '80, când temperatura de sterilizare a fost coborâtă de la 130 la 110°C, iar etapa de extracţie cu solvenţi organici a fost eliminată. Ar fi interesant de clarificat modul în care PrP^{sc} din carnea infectată este transportată din intestin în SNC. Celulele dendritice vasculare pot fi un rezervor pentru HIV la pacienţii SIDA şi pentru proteina PrP^{sc} în maladia prionică Creutzfeld-Jacob.

Fracția infecțioasă a creierului de ovine se distinge printr-o rezistență foarte mare la tratamentele care alterează acizii nucleici (razele γ și UV) și este insensibilă la formaldehidă și la temperaturile care inactivează toate virusurile cunoscute. Agentul infecțios poate să reziste la 360° căldură uscată. O infecțiozitate reziduală persistă chiar după incinerarea la 600°.

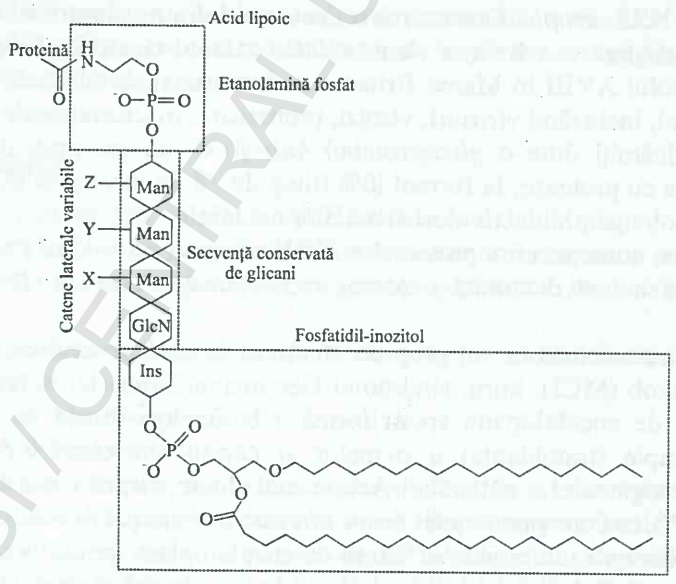
Fracția infecțioasă este, în general, inactivată prin procedee care modifică proteinele: ureea, proteinaza K, SDS (dodecil sulfat de sodiu), fenolul, tripsina, tiocianatul de guanidină.

24.5.1. Proteina neuronală PrP^c

Atât în creierul de hamster infectat experimental cu mojarat de creier de oaie cu maladie prionică scrapie, cât și în creierul pacienților umani cu maladii prionice s-au identificat prin metode fizice, două *izoforme* de proteine prionice.

Proteina prionică neuronală normală (PrP^c) este o sialoglicoproteină, sintetizată în neuronii și în celulele gliale ale SNC, în leucocite și în alte țesuturi în cantități limitate. Denumirea a fost dată de Prussiner și col. (1982). Proteina se sintetizează la nivelul reticulului endoplasmic, este glicozilată în aparatul Golgi și transportată la suprafața neuronilor, unde este "ancorată" de membrana celulară printr-o "ancoră" glicolipidică (glicozil-fosfatidil-inozitol – GPI*) și nu are domeniu citoplasmatic. De aceea, PrP^c se poate elibera de pe suprafața celulei după tratamentul cu enzima bacteriană fosfolipaza C specifică PI (PI-PLC), care clivează regiunea diacil-glicerol a ancorei. De la acest nivel, PrP^c este endocitată și probabil recirculată, fiind în final degradată de proteaze, ca parte a metabolismului celular. PrP^c este transportată din pericarion, prin axon și este localizată în primul rând la nivelul sinapsei, așa cum se evidențiază pe imaginile de imuno-electrono-microscopie. PrP^c este nepatogenă și netransmisibilă. Structura spațială este de tip α-helix, iar funcția este necunoscută.

* GPI constă dintr-un lanț glicanic ce conține etanolamină (legată amidic de aminoacidul C-terminal), glucozamină neacetilată și 3 resturi de manoză legate de inelul de inozitol al fosfatidil-inozitolului (PI), inclus în lama externă a membranei. Un lanț glicanic conservat leagă fosfatul etanolaminei de PI. Partea hidrofobă a PI inclusă în stratul lipidic este formată din catene hidrocarbonate a căror lungime și grad de saturare diferă. GPI este ancoră de legare pentru proteina scrapie, CEA, DAF, CD_{14}, CD_{16}, CD_{58}, CD_{59} etc. Ins = inozitol.



Proteina PrP^c umană conține 253 aminoacizi (254 la șoarece și 264 la bovine). *In vitro*, PrP^c este sensibilă la acțiunea proteazelor. Proteina are două domenii: N-terminal și C-terminal, fiecare de circa 100 aminoacizi. Domeniul C-terminal este pliat în conformație α-helix (3 domenii cu conformație α-helix și o scurtă secvență β-pliată antiparalelă), stabilizată printr-o legătură S-S între helixurile 2 și 3. Molecula are două seturi de glicozilare legate de Asp, iar rolul este incert. Localizarea la suprafața celulei neuronale ar putea să reflecte rolul în aderența celulară, în legarea unui ligand sau o posibilă funcție de semnalizare. Domeniul N-terminal conține o secvență de 8 aminoacizi repetată de

5 ori (octapeptidul repetitiv), bogată în glicină şi prolină, care *in vitro*, leagă Cu* şi Zn. *In vivo*, PrP^c ar putea avea rol în transportul şi metabolismul Cu.

Cuprul pare să aibă un rol esenţial în protecţia SNC faţă de stresul oxidativ şi faţă de maladiile degenerative.

* Cu este un oligoelement esenţial pentru viaţă. Are două grade de oxidare: +1 şi +2. Cu^{2+} este mai stabil. Potenţialul oxidant al cuplului Cu^+/Cu^{2+} funcţionează în diferite reacţii de oxidoreducere, catalizate de enzime dependente de Cu. În exces, Cu este toxic. Dereglarea metabolismului Cu are ca rezultat creşterea ratei de producere a radicalilor liberi. SNC este foarte sensibil la leziunile cauzate de radicalii liberi, pentru că este un ţesut sărac în enzime antioxidante (SOD Cu/Zn, catalază şi peroxidaze) şi bogat în substraturi uşor oxidabile (acizi graşi polinesaturaţi).

În SNC, PrP^c şi ARNm sunt larg distribuite, dar se găsesc în special în neocortex, hipocampus, celule Purkinje şi în neuronii motori spinali. PrP^c este sintetizată în cisternele RE şi, în drumul spre suprafaţa celulei, trece prin cisternele Golgi. În timpul sintezei, este supusă modificărilor post-traducere: clivarea peptidului semnal N-terminal, adăugarea catenelor oligozaharidice N-lincate la două situsuri, formarea unicei legături S-S şi legarea de ancora GPI. Ancora GPI este este adăugată în RE.

Traficul PrP^c a fost studiat pe linii celulare transfectate ce exprimă proteina: PrP^c este reciclată constitutiv între membrana plasmatică şi compartimentul endocitar, din care majoritatea moleculelor sunt reciclate intacte spre suprafaţă, iar restul sunt clivate proteolitic. O parte a moleculelor legate de membrană sunt eliberate în mediul extracelular prin clivajul ancorei GPI. Existenţa căii de reciclare sugerează că o funcţie fiziologică a PrP^c ar fi cea de receptor pentru înglobarea unui ligand extracelular. Un posibil ligand ar fi Cu, care după ce este eliberat în compartimentul endocitar şi transferat altor proteine transportoare, PrP^c s-ar întoarce la suprafaţa celulei pentru a-şi relua ciclul.

A II-a formă este *proteina prionică patologică* (PrP^{sc}). După infecţia experimentală *in vivo*, proteina prionică este produsă de neuroni, astrocite. *In vitro*, un număr mic de linii celulare par a fi sensibile la infecţia prionică (Harris, 1999). Nu se cunoaşte mecanismul prin care proteina patologică este înglobată în celulele sensibile. Celulele infectate produc nivele scăzute de PrP^{sc} rezistentă la proteaze, insolubilă în detergenţi şi infecţioasă.

Analiza celor două proteine prin metode fizice sugerează că conversia PrP^c în PrP^{sc} este conformaţională, nu covalentă. Cele două izoforme au aceiaşi secvenţă primară de aminoacizi, dar creşte cantitativ conformaţia β-pliere, cu o uşoară scădere a conformaţiei α-helix.

Mecanismul conversiei proteinei PrP^c în PrP^{sc} este ipotetic. Chaperonii (proteine ce asistă plierea polipeptidelor în timpul biosintezei şi transportului în organite, previn agregarea proteinelor în timpul stresului, aşa cum este stresul termic) ar fi implicaţi în acest fenomen. Un chaperon ar interacţiona cu capătul C al PrP^c şi astfel proteina normală şi-ar schimba conformaţia. Situsul conversiei ar fi membrana citoplasmatică sau compartimentul endosomal.

24.5.2. Originea şi apariţia prionilor

Prionii au 2 origini: *endogenă şi exogenă* (infecţioasă).

Originiea exogenă a prionilor a fost demonstrată experimental de Bassler (1986), prin inocularea intracerebrală a hamsterilor cu mojarat de creier de oaie, cu boala scrapie.

Proteina patologică PrP^{sc} endogenă ar putea avea două provenienţe:

– prin *reciclarea proteinei celulare*, proces în care se face conversia PrP^c la PrP^{sc};

– prin *mutaţia punctiformă a genei Prn-p*, codificatoare a proteinei normale.

Mutaţiile punctiforme, extrem de rare la nivelul genei Prn-p, au drept consecinţă formarea unei proteine prionice modificate, denumită după numele bolii la care a fost studiată, *PrP scrapie sau* PrP^{sc}. Denumirea a fost păstrată pentru agenţii patogeni (prioni) ai tuturor maladiilor din această familie, deoarece mecanismul a fost demonstrat ca fiind comun, inclusiv în cazul maladiilor prionice umane.

Studiul secvenţei aminoacizilor la cele două tipuri de proteine a demonstrat prezenţa a peste 18 tipuri de mutaţii punctiforme. Cele mai frecvente sunt cele care determină înlocuirea aminoacidului 66 (glicocol din PrP^c, cu prolina în PrP^{sc}, sau a aminoacidului 102 (leucina) din PrP^c, cu prolina în PrP^{sc}.

Prusiner şi Hsiao (1988) au stabilit existenţa unei relaţii directe între mutaţii şi maladie, evidenţiind prezenţa acestora în structura PrP^{sc} la toţi pacienţii cu maladii prionice.

Maladia prionică moştenită poate să fie rezultatul destabilizării conformaţiei PrP^c, ceea ce predispune molecula la tendinţa de agregare sau o mutaţie uşurează interacţiunea dintre PrP^c şi PrP^{sc}.

Există o relaţie directă între proteina normală şi cea patologică (fig. 452). Proteina Prp^{sc}, mutantă sau de origine infecţioasă, *acţionează asupra echivalentului său celular* normal PrP^c, în sensul că, venind în contact cu aceasta, determină deplierea ei de la forma normală de *α-helice* şi replierea ei într-o conformaţie nouă, de tip *β-pliere*. În timpul infecţiei prionice are loc o interacţiune fizică înalt specifică între PrP^c şi PrP^{sc} şi se produce *conversia conformaţională* a proteinei, care face PrP^{sc} rezistentă la degradarea cu proteaze şi îi conferă caracterul infecţios şi patogen.

Pe de altă parte, PrP^{sc} poate să rezulte printr-o mutaţie de *inserţie*, care determină expansiunea regiunii octapeptidului repetitiv, asociată cu maladia prionică moştenită.

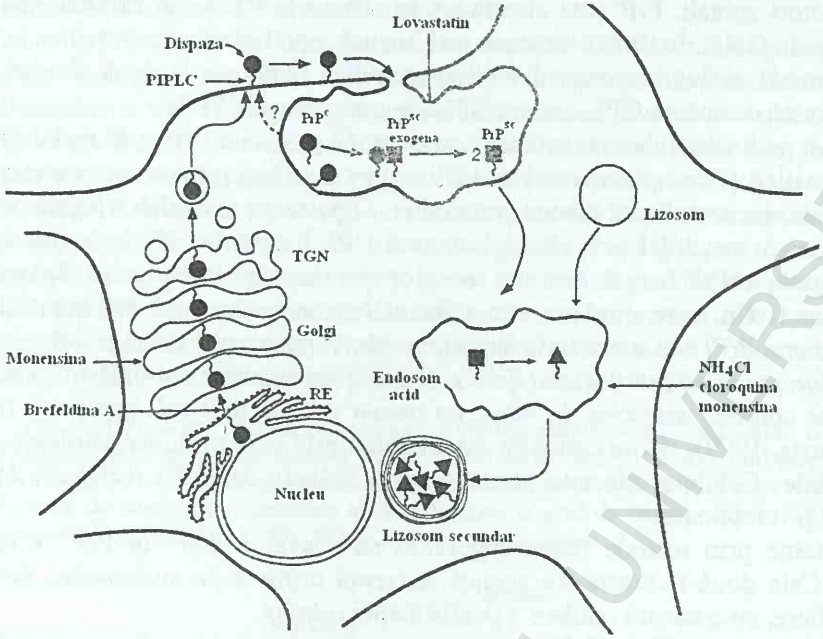
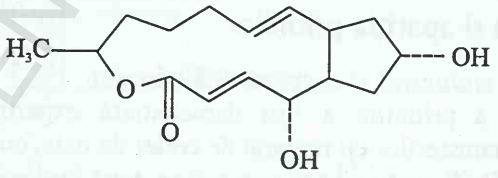


Fig 452. Căile sintezei şi degradării proteinei prionice în celulele cultivate. Pătratele simbolizează PrP^{sc} (proteina *scrapie*), iar cercurile semnifică PrP^c (proteina prionică). PrP^c, precursorul PrP^{sc}, este sensibilă la digestia cu dispază sau cu PIPLC adăugate în mediu. PrP^c este endocitată, în condiţii normale fiind recirculată şi ulterior degradată de proteaze, ca parte a metabolismului celular. Într-un proces infecţios, are loc interacţiunea PrP^c cu proteina PrP^{sc} exogenă (infecţioasă), în cursul căreia PrP^c este convertită la proteina patologică, fără implicarea reticulului endoplasmic şi a cisternelor Golgi. În celulele cultivate, dar nu în creier, capătul N-terminal al PrP^{sc} este clivat ulte-rior, în endosomul acid, cu formarea PrP 27–30 (triunghi) şi acumularea acesteia în lizosomul secundar. PIPLC = fosfolipaza C ce clivează specific PI (după Prussiner, 1996). Brefeldina, produsă de *Penicillium brefeldianum*, este un antibiotic macrolid utilizat pentru studiul traficului membranar şi al dinamicii organitelor. Blochează translocaţia proteinelor din RE în cisternele Golgi. Dispaza este o protează ce clivează fibronectina, colagenul de tip IV şi mai puţin colagenul tip I. Enzima clivează specific legăturile leucină-fenilalanină. Lovastatin este un medicament din clasa statinelor, administrat pacienţilor cu hipercolesterolemie ca agent hipolipidemic. Este sintetizat de *Pleurotus ostreatus* (ciuperca stridie), care conţine 2,8% lovastatin din greutatea uscată. Lovastatin este un inhibitor al 3-hidoxi-3-metil-glutaril-CoA reductazei, o enzimă ce catalizează conversia HMG- CoA la mevalonat. Mevalonatul este un precursor al colesterolului.



Structura chimică a brefeldinei

PrP^{sc} se extrage din creierul bolnav sub formă agregată, insolubilă în detergent, neadecvată analizei prin tehnicile de rezoluţie structurală înaltă. Totuşi, se acceptă conversia *conformaţională* a PrP^c în PrP^{sc}. Cele două variante ale proteinei au aceiaşi secvenţă de aminoacizi. Schimbarea conformaţiei presupune o creştere cantitativă substanţială a structurii *β-pliere*, cu o uşoară descreştere a structurii *α-helix*. PrP^c are circa 42% structură α-helix şi 3%, β-pliere, iar PrP^{sc} are 30% structură α-helix şi 43%, β-pliere.

Mecanismul formării PrP^{sc} (adică 'replicarea prionilor') poate fi diferit pentru formele *infecţioase* şi pentru cele *genetice*.

Inocularea experimentală a animalelor sensibile cu diluţii foarte mari de omogenat de creier infectat cu scrapie, sau de la bolnavi cu maladia Creutzfeldt-Jakob, a evidenţiat că în creierul acestora

se acumulează mari cantități de prioni (până la 10^8 DL_{50} unități infecțioase). *In vitro*, numai unele linii celulare neuronale sunt sensibile la infecția cu prioni scrapie.

PrP^{sc} de origine exogenă (infecțioasă) are rolul de catalizator pentru conversia PrP^c endogen, la starea PrP^{sc}. Prionii de proveniență *exogenă* interacționează cu moleculele normale de proteină prionică celulară (PrP^c), pe măsură ce acestea sunt sintetizate, imprimându-le propria lor conformație specială (tip β-pliere), transformându-le în proteine prionice (PrP^{sc}). Fiind rezistente la degradarea enzimatică, proteinele prionice se acumulează în neuroni, determinând vacuolizarea și necroza lor. Prionii eliberați pe această cale, sunt adsorbiți pe neuronii normali adiacenți, determinând extinderea procesului patologic. Locul neuronilor lizați este luat de celulele gliale.

În ceea ce privește *prionii de origine endogenă*, PrP^{sc} este rezultatul mutațiilor punctiforme multiple care se produc în gena codificatoare a proteinei normale (Prn-p). Astfel, proteina normală este transformată spontan în proteina patologică PrP^{sc}.

24.5.3. Transmiterea experimentală a prionilor

Prionii reprezintă forma modificată a unei proteine celulare normale (PrP^c). Prusiner (1986, 1993) a demonstrat originea *exogenă* a proteinei prionice prin *transmiterea experimentală a maladiilor prionice.* Transmiterea interspecifică a prionilor este un proces întâmplător, cu o perioadă lungă de incubație (de ordinul anilor), fiind limitată de bariera de specie. La pasajul primar al prionilor de la specia A la specia B, nu toate animalele inoculate ale speciei B fac boala, iar perioada de incubație este lungă. Transmiterea de la oaie la capră, prin injectarea mojaratului de creier, s-a demonstrat în 1936. Eficiența barierei de specie poate fi cuantificată prin durata perioadei de incubație, dar mai ales prin studii de titrare comparativă, adică prin diluarea inoculului și compararea valorilor DL_{50}.

Agentul etiologic a rămas necunoscut și Sigurdson (1954) a folosit termenul de "infecție virală lentă". Prin pasaje succesive la indivizi ai aceleiași specii, timpul de incubație se scurtează progresiv de la un pasaj la altul și propagarea devine predictibilă.

Bariera de specie nu funcționează (sau nu funcționează totdeauna) și are importanță practică pentru *evaluarea riscului* ca omul să dezvolte maladia Creutzfeldt-Jakob, după consumul creierului de oaie infectată cu scrapie sau de bovine infectate cu prionul encefalopatiei spongiforme.

După inoculare, perioada de incubare este de 1–3 ani. Odată declanșate, bolile prionice au o evoluție clinică cu agravare progresivă de-a lungul mai multor luni sau ani, care duce invariabil la moarte. Experiențele pe oi și capre, prin inoculare *intracerebrală, orală, subcutanată, intramusculară* sau *intravenoasă*, au arătat existența gradelor diferite de sensibilitate a diferitelor rase de animale, mai ales după inocularea subcutanată, ceea ce sugerează că fondul *genetic* influențează decisiv sensibilitatea la infecția prionică. Adeseori, multe dintre animalele inoculate, nu dezvoltă maladia.

24.5.4. Patogenitate

Prionii produc o varietate de *boli neurologice degenerative*, care afectează ovinele și caprinele (maladia scrapie), bovinele (encefalopatia spongiformă sau boala "vacii nebune"), felinele, cervidele, nurcile etc., precum și omul. Bolile prionice sunt limitate la SNC și evoluează cu leziuni degenerative tipice pentru *encefalitele spongiforme*:

- degenerarea spongiformă a substanței cenușii, ce poate să apară la toate etajele encefalului;
- vacuolizarea și necroza neuronilor;
- reacții astrogliale cu hipertrofia astrocitelor și proliferarea lor în cortex (poate fi însoțită de plăci de amiloid). Datorită focarelor multiple de liză neuronală, apar "găuri" care conferă creierului un aspect spongios. La unele organisme se observă depunerea unor plăci de amiloid (colorabile cu roșu de Congo), în SNC. Ele ar putea fi formate din proteine prionice sau din agregate de prioni.

Maladiile prionice pot avea cauze *infecțioase* (agentul prionic este de origine exogenă) sau are origine endogenă (formele *ereditar-familiale* și *sporadice*). Formele sporadice apar spontan în populație, fără nici o cauză aparentă. Prionii maladiilor familiale și sporadice sunt infecțioși și pot fi transmiși prin inocularea mojaratului de creier la organisme ale aceleiași specii sau ale unei specii înrudite.

Maladia scrapie (tramblanța) apare în populații de ovine şi caprine, cu predispoziție genetică, dar faptul că se poate propaga prin inoculare, respinge ideia caracterului pur genetic. Boala se instalează după 2–5 ani de la contaminare, cu tulburări neurologice: prurit intens, dificultate în mers (prin hipoplazia cerebelului), cu agravare progresivă, până la imobilitate totală, cu sfârşit letal. Principalele leziuni apar însă în creier, care degenerează lent.

Infecția naturală se face pe *cale digestivă* cu proteine prionice din ingredientele de origine animală. Rezistența prionilor la proteaze permite păstrarea infecțiozității în tractul digestiv. Nu se cunoaşte mecanismul prin care prionii depăşesc bariera intestinală, dar ar putea fi implicate celulele M. Inițial, infecția evoluează la nivelul sistemului limfoid (plăcile Peyer şi splină). PrP^{sc} se acumulează în celulele foliculare dendritice (celule cu viață lungă), prin intermediul cărora prionii sunt diseminați în splină. Din țesutul limfoid, proteina prionică invadează SNC, pe calea fibrelor vegetative ale țesutului limfoid, cu răspândire retrogradă spre măduva spinării sau pe calea vagului la trunchiul cerebral. Replicarea prionilor în SNC se face cu o rată înaltă până la apariția simptomelor clinice. La primatele şi ovinele infectate experimental cu agentul ESB, proteina prionică s-a detectat la nivel scăzut, în sânge. Proteina prionică sanguină a ovinelor este infecțioasă şi se poate transfera intraspecific. Apariția maladiei trebuie urmată de sacrificarea întregului efectiv de animale.

Maladiile prionice umane au fost clasificate în câteva tipuri: boala Creutzfeldt-Jacob (CJD), sindromul Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), insomnia familială letală (IFL) şi kuru. Sunt maladii rare (1–2 cazuri/un million/an), dar au fost studiate datorită particularităților agentului etiologic şi de teama că ESB ar putea să constituie un risc de sănătate publică prin consumul țesuturilor animale infectate.

Maladiile prionice sunt *exogene* (de natură infecțioasă) sau *endogene*, adică sunt moştenite prin predispoziție genetică, iar altele au caracter *sporadic* (apar fără cauze cunoscute). Formele sporadice nu au etiologie infecțioasă sau genetică şi se pot atribui *conversiei spontane* a PrP^{c} la starea PrP^{sc} sau existenței unei mutații somatice nedetectate în proteină, ce favorizează conversia la PrP^{sc}.

Formele *infecțioase* ale maladiei prionice sunt rezultatul transmiterii orizontale a prionilor infectioşi. Cele mai cunoscute sunt boala "kuru" şi boala Creutzfeldt-Jacob.

Boala Creutzfeldt-Jacob (CJD) are o frecvență de 1 la un milion şi apare în jurul vârstei de 60 de ani, cu mişcări anormale, rigiditate, tulburări psihice de tip demențial. Apare *sporadic* (caracter ereditar-familial), datorită unor evenimente rare de mutație somatică a genei Prn-p) sau prin *infecție exogenă*, după unele practici medicale (iatrogenice) (transplantul de cornee sau de duramater, injecții de hormoni hipofizari, în special a celor de creştere, obținuți din hipofiza umană recoltată de la cadavre, după implantarea electrozilor contaminați pentru EEG sau prin operații chirurgicale cu instrumente contaminate). Transmiterea prin infecție exogenă este argumentată de apariția maladiei prionice la persoane foarte tinere. Varianta nouă a CJD (nCJD) pare să se transmită pe cale digestivă, prin consumul cărnii de la bovinele cu encefalopatie spongiformă. Deşi propagarea interspecifică a prionilor este un eveniment aleatoriu şi are o frecvență mică, PrP^{sc} a fost transmisă la bovine prin hrănirea cu făină rezultată de la ovinele cu scrapie, la care produce encefalopatia spongiformă (BSE). BSE s-a transmis la om, pe cale digestivă sub forma nCJD. Această modalitate de propagare a fost confirmată prin analiza secvenței aminoacizilor prionilor BSE şi CJD. Intre '95–2000 au fost înregistrate 51 cazuri de nCJD. În contrast cu CJD clasic, nCJD a apărut la persoane tinere, pentru că maladia la persoanele în vârstă poate fi mascată de demența senilă.

Boala *kuru*[*] afectează exclusiv populația tribului Fore din Papua-Noua Guinee şi este caracterizată prin pierderea coordonării motorii, accentuată progresiv, astfel încât bolnavii necesită sprijin atât aşezați, cât şi în poziție verticală. Trăsătura clinică principală a maladiei este ataxia cerebeloasă. În contrast cu CJD, demența este mai puțin evidentă. Maladia se transmite pe cale digestivă, datorită canibalismului ritual (cinstirea înaintaşilor prin consumul creierului cadavrelor).

[*] Termenul "kuru" reflectă principalele simptome ale bolii şi este tradus prin "a tremura de frică, 'a se infiora' sau 'moartea zâmbind'.

Sindromul Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) este o varietate naturală a bolii Creutzfeldt-Jacob, caracterizată prin instalarea precoce a incapacității de coordonare a mişcărilor, prin leziuni cerebeloase şi demență.

Insomnia familială letală (IFL) debutează cu tulburări ale somnului şi ale sistemului nevos vegetativ, urmate de demenţă.

Descoperirea mutaţiilor în genele PrnP la bolnavii cu CJD, GSS şi IFL, a dus la concluzia că bolile prionice sunt atât genetice, cât şi infecţioase.

Diagnosticul maladiilor prionice este histologic. Nu se produc modificări serologice. Proteina patologică poate fi detectată cu AMC, în biopsiile de ţesut limfoid.

Semnificaţie biologică. Existenţa prionilor (proteine infecţioase, replicabile pe o cale neobişnuită), a sugerat posibilitatea transmiterii unor maladii infecţioase în absenţa unui transfer de material genetic codificator al sintezei proteice, ceea ce este în contradicţie cu dogmele *biologiei moleculare*, ale virologiei şi microbiologiei.

Ideia că o proteină este capabilă de autoreplicare printr-o interacţiune proteină-proteină, în absenţa informaţiei genetice şi a circulaţiei ei în celulă, după modelul clasic, este greu de acceptat.

Chesebro şi Fields (1996) consideră că este posibil ca PrP (proteina rezistentă la proteaze) să aibă un rol important în patogeneza maladiei, fără să fie agentul cauzal. Ea ar funcţiona ca un receptor sau ca un cofactor necesar pentru agentul cauzal sau pentru un virus ubicvitar, cu mare rezistenţă la inactivare.

Modificarea structurală a PrP^{c} la PrP^{sc} ar putea fi rezultatul acţiunii unei proteine necunoscute, cu rol de *chaperonină* (Guillemet şi col., 1996). Chaperonii sunt proteine care facilitează plierea polipeptidelor în timpul biosintezei şi transportului în organite şi împiedică agregarea proteinelor în condiţiile stresului celular (ca de exemplu, şocul termic). Chaperonii acţionează prin legarea de substratul lor, uneori dependentă de ATP şi împiedică formarea intermediarilor pliaţi, nefuncţionali. Formarea PrP^{sc} implică modificarea plierii şi agregarea moleculelor, procese în care chaperonii au rol important.

Este posibil ca prezenţa prionilor să fie mult mai largă în natură, şi oricum, nelimitată strict la mamifere.

După Prusiner (1995), este posibil ca mai multe boli nervoase cronice (demenţa presenilă umană de tip Alzheimer, maladia Parkinson, scleroza multiplă, scleroza laterală amiotrofică etc.), cu etiologie necunoscută, să fie produse sau influenţate în evoluţie, de intervenţia unor agenţi patogeni subvirali, de tipul prionilor.

Bolile prionice exemplifică un mecanism de patogenitate bazată pe schimbarea conformaţiei unei proteine care se autopropagă. Probabil că transmiterea informaţiei biologice pe calea conformaţiei proteinei este un fenomen mai general în natură. La levuri şi la fungii filamentoşi s-au identificat proteine care se comportă ca prioni (Harris, 1999).

Bibliografie

Prusiner B. S. 1990. PrP Gene Structure, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Prusiner B.S. 1996. Prions, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.r

Harris D.A. 1999. Cellular Biology of Prion Diseases. Clin. Microbiol. Rev. 12(3) : 429–444.

Chesebro B. 1990. Spongiform Encephalopathies: The Transmissible Agents, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Weissmann C. 1991. A 'unified theory' of prion propagation – Nature, vol. 352: 22: 679–682.

Polish L. B., Gallagher M., Fields H. A., Hadler S. C. 1993. Delta hepatitis: molecular biology and clinical and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev. 6, 211–229.

Aiken J. M., Marsh R. F. 1990. The search for scrapie agent nucleic acid – Microbiol. Rev. 54(3): 242–246.

Collinge J. 2009. Human Prion Diseases, în vol. Principles and Practices of Clinical Virology, sixth edition, Ed. by Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, Barry D. Schoub, Paul D. Griffith, Philip Mortimer, John Wiley & Sons, Ltd.

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

25. VACCINURI VIRALE

Vaccinurile virale pot fi *atenuate, inactivate* (ambele sunt unitare), *subunitare* şi obţinute prin *tehnologia ADN recombinant.*

Vaccinurile cu *virus atenuat* se obţin din tulpinile virale lipsite complet sau aproape complet de patogenitate. Atenuarea este un complex de modificări genetice care duc la pierderea virulenţei agenţilor infecţioşi, dar îşi păstrează capacitatea de a induce un răspuns imun protector de durată la gazdele sensibile. Atenuarea este parte a evoluţiei naturale a agenţilor infecţioşi, dar este utilizată pentru a crea vaccinuri infecţioase. Fiind infecţioase, ele se multiplică în organismul vaccinat şi produc o stimulare antigenică continuă, într-un interval de timp.

Vaccinarea cu virusuri atenuate conferă o imunitate de durată, după administrarea unei singure doze.

25.1. Metode de atenuare a virulenţei virale

1) *Pasajul virusului* de origine umană într-un substrat "nenatural", *in vivo* sau *in vitro*. Cele mai importante vaccinuri pentru om şi animale s-au obţinut pe această cale. Virusul se cultivă în mod repetat, prin inoculare la organisme sănătoase sau în culturi primare de celule: virusul febrei galbene s-a inoculat la şoarece şi apoi în embrionul de găină; poliovirusul s-a inoculat în celulele de rinichi de maimuţă; virusul rujeolei – în fibroblaste de embrion de găină. Pasajul într-un substrat celular "nenatural", selecţionează mutante printr-un cumul de evenimente mutaţionale întâmplătoare. În practica vaccinării, se utilizează cele cu proprietăţi adecvate de atenuare şi imunogenitate. Mutantele care după administrare rămân localizate la poarta de intrare, sunt cele mai utile. Unul dintre marile succese ale acestei metode de atenuare este vaccinul *polio.* Prin pasaje succesive în culturile celulare de rinichi de maimuţă, s-a selectat o linie lipsită de neurovirulenţă, după inocularea intracerebrală sau intraspinală la maimuţă. Vaccinul *rubeolic* s-a obţinut prin cultivarea virusului pe acelaşi substrat, iar liniile folosite ca vaccin *rujeolic* şi al *febrei galbene* s-au cultivat pe fibroblaste de embrion de găină.

2) *Vaccinarea cu un virus înrudit*, de la o altă specie gazdă. Cel mai vechi vaccin viral (Jenner, 1798), utilizat în controlul variolei, este virusul vaccinal, recoltat din leziunile pustulare de pe ugerul vacii. Virusul vaccinal imunizează încrucişat cu virusul variolei (smallpox) şi este protector faţă de infecţia variolică.

Virusul rujeolei imunizează câinele faţă de virusul bolii Carré. Anticorpii faţă de virusul rujeolei neutralizează virusul bolii Carré, dar nu şi invers.

Calea de abordare a lui Jenner pentru obţinerea preparatelor virale utilizabile ca vaccinuri umane este folosită şi astăzi şi implică izolarea unor virusuri de la mamifere sau de la păsări, înrudite antigenic cu diferite virusuri umane. Pasajul lor în celulele diploide umane (CDU) *in vitro,* echivalează cu procesul atenuării. Celulele diploide umane reprezintă un substrat semipermisiv pentru virusurile umane şi mamaliene şi adeseori, multiplicarea lor este lipsită de eficienţă.

Genele virusurilor mamaliene şi aviare, care determină spectrul de gazdă au o mare diversitate a secvenţelor de nucleotide, faţă de genele corespunzătoare ale virusurilor umane. Efortul de a realiza noi vaccinuri, pe calea clasică a lui Jenner, trebuie să se sprijine pe tehnicile de genetică virală, biologie moleculară şi imunologie.

3) *Inocularea virusului patogen* sau parţial atenuat, pe o cale "nenaturală", adică alta decât cea prin care virusul pătrunde în mod obişnuit în organism. Metoda este folosită pentru vaccinarea

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

animalelor (de exemplu, virusul laringotraheitei păsărilor, se administrează prin instilare în ochi). Pentru om, metoda nu se foloseşte, deoarece riscul infecţiei este mare.

Vaccinurile atenuate administrate pe cale orală induc un răspuns seric şi un răspuns imun generalizat al mucoaselor, asigurând o rezistenţă superioară la reinfecţie şi persistenţa memoriei.

Vaccinarea cu un preparat viral atenuat echivalează cu o infecţie uşoară, asimptomatică.

Vaccinurile virale atenuate au avantajul important al stimulării ambelor compartimente ale răspunsului imun: celular şi humoral, atât sistemic cât şi local. Acest fapt este deosebit de important pentru infecţiile virale în care imunitatea mediată celular are un rol esenţial în eliminarea virusului, cât şi pentru infecţiile mucoaselor, în care atât imunitatea locală cât şi cea sistemică, sunt necesare pentru rezistenţa optimă.

Vaccinurile virale atenuate stimulează răspunsul imun faţă de fiecare dintre antigenele protectoare ale unui virus. Imunitatea indusă de aceste vaccinuri este mai durabilă, mai eficientă şi are un spectru mai larg de reactivitate încrucişată, decât cea indusă de virusurile inactivate. Reactivitatea încrucişată este foarte importantă pentru virusurile care suferă variaţie antigenică progresivă.

Virusurile atenuate din vaccinuri, păstrându-şi capacitatea de multiplicare în organismul vaccinat, stimulează îndelung SI şi adeseori necesită o singură inoculare. Ele se răspândesc în populaţie şi imunizează chiar indivizi nevaccinaţi.

Vaccinurile atenuate se produc cu un preţ de cost mai scăzut şi se administrează mai uşor. Spre deosebire de alte vaccinuri atenuate, vaccinul polio Sabin necesită reimunizări, pentru că cele 3 tulpini interferă una cu alta în ciclul de multiplicare în celulele intestinale. După prima imunizare, se va multiplica predominant una dintre tulpini şi va stimula imunitatea specifică. După a II-a imunizare, imunitatea generată de prima inoculare va limita tulpina care a dominat anterior şi va favoriza multiplicarea uneia dintre celelalte două tulpini. A III-a inoculare asigură imunizarea faţă de cea de a III-a tulpină.

Dezavantajele vaccinurilor virale atenuate sunt legate de riscul ridicat al *contaminării* cu agenţi infecţioşi supraadăugaţi. De exemplu, loturile iniţiale de vaccin polio au fost contaminate cu SV_{40}, din celulele de rinichi de maimuţă, dar nu s-a constatat creşterea incidenţei tumorilor la copiii vaccinaţi. Vaccinul atenuat al virusului febrei galbene, multiplicat în fibroblastele de embrion de găină, a fost contaminat iniţial cu virusul leucozei aviare.

Unele virusuri atenuate (rujeolic, rubeolic, al febrei galbene) păstrează un nivel scăzut de *virulenţă reziduală*, care determină infecţii la copiii cu imunodeficienţe.

O problemă importantă, legată de infecţiozitatea vaccinurilor atenuate, este aceea a *restaurării* unui grad variabil de virulenţă după vaccinare, care determină infecţii cu manifestări clinice la copiii imunodeficienţi. Procesul infecţios nu este consecinţa alterării genetice a virusului din vaccin. Din această cauză, vaccinul nu se administrează gravidelor.

Vaccinurile atenuate ridică problema *instabilităţii genetice*. Virusul rujeolic atenuat este labil, în special la variaţiile termice şi de aceea necesită un regim termic constant (+4°), pe toată durata depozitării.

Un alt dezavantaj constă în faptul că virusul atenuat poate să producă o infecţie persistentă. De asemenea, administrarea vaccinului atenuat poate să *interfere* cu virusul de tip sălbatic care infectează natural şi să domine până la anulare eficienţa vaccinării. De exemplu, virusul polio atenuat, se administrează pe cale orală, dar poate să interfere cu o largă varietate de enterovirusuri.

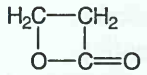
O altă cale de producere a vaccinurilor virale atenuate, genetic stabile, implică obţinerea *mutantelor de deleţie*. Acestea au o capacitate diminuată de multiplicare, ceea ce *echivalează cu atenuarea*. Mutantele prin deleţie trebuie să-şi păstreze infecţiozitatea şi imunogenitatea şi să fie stabile genetic.

25.2. Vaccinuri inactivate

Vaccinurile inactivate conţin virioni care, după tratamentul cu agentul chimic inactivator, nu pot să iniţieze ciclul de multiplicare în substratul permisiv.

Preparatul viral brut se obţine prin cultivarea virusului într-un substrat permisiv: în oul embrionat de găină (virusul influenza), în culturi celulare de rinichi de maimuţă (virusul polio), sau în

fibroblastele embrionare umane şi de embrion de găină (polio, rujeolic, rabic). Preparatul brut se inactivează cu formol, acetil-etilenimina sau cu β-propiolactona.



β-propiolactona

Preparatele virale inactivate, utilizabile ca vaccin au *avantajul* riscului minim al infecţiei. Rareori, preparatele inactivate conţin virus infecţios rezidual, care a rezistat tratamentului de inactivare, sau care provine din contaminarea cu un alt virus.

Vaccinurile virale inactivate au câteva *dezavantaje*. Uneori, tratamentul cu un agent chimic *anulează imunogenitatea* unor proteine virale, astfel încât răspunsul imun faţă de virusul inactivat nu este protector. De exemplu, inactivarea cu formol a virusului rujeolic anulează imunogenitatea proteinei de fuziune (F), iar vaccinul îşi pierde proprietatea protectoare.

Vaccinurile inactivate *nu stimulează imunitatea mediată celular* (mediată de limfocitele Tc), care au rol decisiv în eliminarea celulelor infectate cu virus şi în rezistenţa la infecţiile cu o gamă largă de virusuri.

Preţul de cost al vaccinurilor inactivate este mai mare.

Preparatele virale inactivate, folosite ca vaccinuri, se obţin din virusul rabic cultivat în CDU şi în embrionul de raţă, din virusul oreionului şi din virusul influenza, cultivate în embrionul de găină, din virusul polio, cultivat în celulele de rinichi de maimuţă. Toate sunt inactivate cu β-propiolactonă sau cu formol.

Preparatul inactivat al virusului hepatitei B este o realizare recentă, dar este foarte costisitor pentru că virusul nu se cultivă în sisteme celulare *in vitro*, iar tehnicile de purificare a virusului din serul pacienţilor infectaţi cronic sunt foarte laborioase.

Unele virusuri – rujeolic, oreionului, rubeolei, variolei sunt stabile antigenic şi sunt adecvate preparării şi administrării vaccinurilor. Dar nu totdeauna un virus stabil antigenic este adecvat pentru o vaccinare de succes, deoarece virusurile au numeroase modalităţi de evaziune a RI.

Succesul vaccinării se corelează, în general invers, cu gradul variaţiei antigenice a virusului. Prin variaţie antigenică se înţelege faptul că diferite izolate ale aceluiaşi virus au un grad diferit de reactivitate încrucişată cu un ser standard. Vaccinurile cu virusul rujeolei, oreionului, rubela au scăzut incidenţa infecţiei spre 0, dar nu există vaccin pentru VRS. Nu toate virusurile stabile antigenic pot furniza vaccinuri eficiente, deoarece posedă mecanisme prin care scapă acţiunii efectorilor imunitari: unele rămân ascunse în SNC, altele induc sinteza unor citokine ce blochează semnalizarea imunitară, sau a unor proteine cu aceiaşi funcţie (Air şi colab., 2008).

25.3. Vaccinuri subunitare

Iniţial, vaccinurile s-au obţinut din preparatele brute de virus, după multiplicarea lor într-un ţesut (*in vivo*) sau în culturi celulare. Pe măsură ce a fost posibilă obţinerea unor titruri înalte de virus, în scopul diminuării toxicităţii vaccinului, s-a trecut la purificarea virusului şi a unor componente virale.

Vaccinurile subunitare conţin *proteine virale* în care se găsesc localizate situsuri antigenice majore şi care se pot substitui virionilor în practica vaccinării. De exemplu, pentru virusul influenza, vaccinul subunitar conţine antigenele de suprafaţă HA şi NA. Preparatul este mai puţin toxic decât virusul integral inactivat, dar este mai puţin eficient în stimularea răspunsului imun. Proteinele F şi G ale RSV s-au purificat din virusul cultivat *in vitro*.

Celulele mamaliene reprezintă un sistem optim pentru producerea proteinelor virale, utilizabile ca vaccinuri subunitare. Celulele în cultură se infectează cu virus şi din lizatele celulare se purifică antigene proteice. În lizate se găseşte o cantitate mare de proteine virale în exces, neîncorporate în virioni.

Obţinerea vaccinurilor subunitare proteinice virale, în culturile de celule animale ridică probleme dificile de purificare a proteinelor virale, din amestecul cu proteinele celulare. Dacă se folosesc linii celulare continue, trebuie îndepărtat ADN celular, potenţial oncogen.

25.3.1. Tehnici moderne de obţinere a vaccinurilor subunitare

Dezvoltarea biologiei moleculare şi cunoaşterea mecanismelor RI, a stimulat preocupările privind obţinerea unor vaccinuri noi. Genele codificatoare ale antigenelor au fost clonate prin *tehnologia ADN recombinant* (tehnicile de inginerie genică).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vaccinurile obținute prin tehnologia ADN recombinant conțin proteine în care sunt localizați epitopii imunodominanți protectori ai agentului infecțios. Genele codificatoare ale antigenelor suprafeței virale, bacteriene şi ale protozoarelor, se pot izola după fragmentarea genomului sub acțiunea catalitică a *enzimelor de restricție*. Prin tehnologia ADN recombinant, genele se inseră în celula procariotă (*E. coli, B. subtilis*), sau în celule bacteriene sau eucariote (levuri, celule de insecte sau mamaliene).

Fragmentarea genomului cu endonucleaze de restricție este posibilă numai pentru dezoxiribovirusuri. Genomul ARN trebuie mai întâi transcris în ADNc şi ulterior poate fi utilizat în tehnicile de ADN recombinant. Genomul ARN de polaritate pozitivă este adecvat scopului clonării, dar nu a fost clonat ADNc al unei catene de ARN de polaritate negativă.

Celulele de mamifere reprezintă substratul optim pentru clonarea genelor şi pentru producerea proteinelor virale, deoarece plierea, transportul celular şi prelucrarea proteinelor sunt asemănătoare celor ce au loc în celula infectată de virusul natural. Celulele produc cantități mari de antigen viral, codificate de gena clonată.

Tehnicile de clonare genică se folosesc pentru sinteza proteinelor unor virusuri, care nu se multiplică *in vitro,* în sistemele celulare uzuale. De exemplu, gena pentru sinteza antigenului HBs a fost inserată într-o plasmidă şi clonată de levuri. Proteina virală este neglicozilată, dar este imunogenă pentru om şi induce sinteza anticorpilor protectori față infecția naturală. S-au clonat genele codificatoare ale glicoproteinelor de HSV, VEB, HIV, VRS (virusul respirator sincițial).

ADN viral este funcțional chiar în celula procariotă, după transferul prin intermediul unui vector (plasmida sau fag). Astfel s-au sintetizat antigene de poliovirus, antigenul HBs, antigenul virusului hepatitei A, HA şi NA ale virusului gripal.

Pentru purificarea glicoproteinelor virale din celulele infectate în care a fost clonată gena, s-a folosit *tehnica cromatografiei de afinitate cu anticorpi monoclonali* (AMC) sau alte tehnici de separare (cromatografia cu lectine, tehnici de separare fizică).

O variantă a tehnicilor de ADN recombinant este aceea de obținere a vaccinurilor cu *virusul vaccinal hibrid.* Genomul poxvirusurilor conține circa 200 de gene. Unele sunt esențiale pentru multiplicarea virală, dar un interes deosebit prezintă genele neesențiale pentru ciclul de multiplicare. Cele neesențiale reprezintă circa 30% din genom şi sunt grupate la extremitățile genomului ADN dublu catenar linear. În plus, genomul este împachetat lax în virion. Aceste particularități au permis obținerea, prin tehnicile de inginerie genică, a *poxvirusurilor recombinate*, infecțioase, capabile să exprime genele străine inserate în genomul lor.

ADN viral este inserat în genomul virusului vaccinal prin recombinare la situsuri omologe. Virusul vccinal hibrid se multiplică în celulele permisive şi genele inserate în genomul său codifică antigenul HBs, antigenul rabic, antigenul HSV etc.

Vaccinurile virale hibride sunt stabile şi stimulează ambele compartimente ale răspunsului imun.

Antigene peptidice sintetice. Utilizarea AMC a făcut posibilă identificarea epitopilor cu rol esențial în stimularea răspunsului imun. Producerea şi utilizarea antigenelor sintetice s-a impus după demonstrarea bazelor moleculare ale imunogenității şi după studiile privind proprietățile imunogene ale antigenelor artificiale. Pe de altă parte, s-a demonstrat ca macromoleculele proteice sau glicoproteice din structura virusurilor şi a microorganismelor infecțioase, au un număr mare de determinanți antigenici, dar numai un număr limitat dintre aceştia au semnificație imunogenă şi un număr foarte mic sunt inductori ai răspunsului imun protector.

Sinteza artificială a peptidelor a devenit posibilă după introducerea metodelor de secvențiere a ADN. Cunoaşterea secvenței bazelor a permis dirijarea secvenței de aminoacizi a proteinelor cu activitate biologică.

Vaccinurile sintetice conțin secvențe polipeptidice sintetizate pe cale chimică. Ele includ determinanți antigenici esențiali pentru inducerea unui răspuns imun protector față de agenții patogeni corespunzători.

Condiția esențială pentru obținerea vaccinurilor sintetice este cunoaşterea structurii chimice a determinanților antigenici nativi ai virusului (sau ai microorganismelor patogene) şi identificarea regiunilor imunodominante ale moleculei.

Tehnicile de cristalografie cu raze X, cromatografia în faza lichidă, au permis identificarea situsurilor antigenice majore ale unor virusuri foarte importante pentru clinică. De exemplu, s-a

determinat structura tridimensională a hemaglutininei virusului gripal şi s-au identificat *regiunile calde ale moleculei*, care, cu mare probabilitate, corespund determinanţilor antigenici.

S-a stabilit secvenţa aminoacizilor, care a fost reprodusă în proteinele sintetizate artificial.

Marea majoritate a peptidelor sintetice sunt secvenţe scurte, lineare de aminoacizi, care reproduc un fragment din structura primară a moleculei proteice. Dezavantajul major este că secvenţele sintetice nu reproduc configuraţia spaţială a determinanţilor antigenici naturali, în special a celor discontinui. Aceştia sunt alcătuiţi din resturi de aminoacizi neadiacenţi în structura primară a moleculei, dar pot fi juxtapuşi în structura tridimensională a proteinei pliate. Astfel se explică slaba imunogenitate a peptidelor sintetice. Ameliorarea calităţilor de imunogenitate ale peptidelor sintetice, utilizabile ca vaccinuri, depinde de gradul de asemănare a conformaţiei lor, cu determinantul antigenic nativ.

Dimensiunile mici ale peptidelor sintetice impun cuplarea lor cu o moleculă purtător, pentru creşterea gradului de imunogenitate. S-a folosit hemocianina de *Megathura* (KHL), cuplată prin intermediul glutaraldehidei sau a unei grupări tiol a unui rest de cisteină, adăugat la o extremitate a secvenţei sintetice.

S-au sintetizat peptide care reproduc secvenţe de aminoacizi ale unor polipeptide ale virusului hepatitei B, cu diferite eficienţe imunoprotectoare, precum şi peptide care reproduc unele secvenţe ale hemaglutininei virusului gripal.

Polipeptidele sintetice utilizate ca vaccinuri, au avantajul că nu conţin alte componente care ar putea produce efecte secundare şi stimulează răspunsul imun strict specific faţă de epitopii antigenici critici ai agentului infecţios. Sunt stabile indefinit şi se produc la un preţ de cost scăzut. Au însă dezavantajul major de a nu stimula răspunsul imun mediat celular.

Vaccinurile ADN. O strategie recentă a terapiei genice (Roitt, 2007) implică legarea ADN încărcat negativ de lipidele cationice, care s-ar ataşa de suprafaţa încărcată negativ a celulelor vii şi ulterior ar fi endocitat de celule. Injectarea preparatului fără lipide arată o rată mai înaltă de înglobare a ADN şi expresia proteinei codificate. Astfel s-a născut tehnologia vaccinării cu *ADN nud.*

Metoda constă în injectarea directă a acidului nucleic (ARN sau ADN) codificator al proteinelor antigenice de interes clinic, în *muşchiul scheletic,* unde codifică îndelung proteina. Iniţial s-a injectat ADN al genei *luciferazei* şi proteina a fost sintetizată.

Vaccinul ADN constă dintr-o genă ADNc, cu o secvenţă terminală poli-A, un promotor viral şi o secvenţă CpG bacteriană, clonată într-o plasmidă bacteriană. ADN este prelucrat *in vitro* pentru expresia optimă în celulele eucariote: plasmida necesită o *origine a replicării* (ce permite multiplicarea în celula bacteriană, *E. coli*); o *genă de rezistenţă* la antibiotice (ampicilină), care permite selecţia celulelor purtătoare de plasmidă pe mediul cu antibiotic; un *promotor viral* (din CMV sau SV_{40}) pentru expresia optimă în celulele mamiferelor. ARNm trebuie să fie stabil.

Celula pivot care prezintă Ag este CD, care poate fi transfectată direct sau poate să endociteze direct Ag eliberat de celulele musculare în spaţiile interstiţiale şi poate îngloba celulele lezate sau moarte după injectarea ADN. Prin intermediul TLR 9, secvenţele CpG stimulează sinteza IFNα şi β, IL-12, stimulatoare ale IMC via Th_1 şi a IMH.

Pentru cele mai multe infecţii bacteriene, protecţia primară este mediată de IMH. Pentru infecţiile intracelulare (*M. tuberculosis., L. monocytogenes*), protecţia este mediată de IMC. Protecţia anti-HIV, herpes, malarie este conferită de IMH şi IMC. Antigenele exogene (din agenţii patogeni inactivaţi) sau proteinele derivate din vaccinurile vii sunt endocitate de CPA şi prezentate de moleculele CMH II. Moleculele sintetizate în celulă sunt prezentate în asociaţie cu moleculele CMH I.

Vaccinul ADN se aseamănă, funcţional, cu vaccinul atenuat, pentru că stimulează IMH şi IMC. ADN este eliberat în celulă, transcris şi celula secretă Ag codificat.

Cantitatea de Ag produs *in vivo*, după inocularea ADN este cuprinsă între *ng* şi *pg*.

Sunt cel puţin 3 mecanisme prin care Ag codificat de ADN plasmidial este prelucrat şi prezentat pentru a stimula RI:

- stimularea directă de către celulele *somatice* (miocite, keratinocite sau alte celule negative pentru CMH II);
- transfecţia directă a CPA profesioniste (CD);
- stimulare încrucişată, în care ADN plasmidial este preluat prin transfecţie de celule somatice şi/sau de CPA profesioniste, iar proteinele secretate sunt preluate de alte CPA profesioniste şi prezentate celulelor T.

AND plasmidial pare să se integreze în ADN cromosomal sau este menținut perioade lungi sub formă episomală. Antigenul este exprimat nu numai de celulele musculare, ci și de celulele dendritice din zonă care înglobează ADN plasmidial. Ulterior s-a injectat plasmida codificatoare a nucleoproteinei de virus gripal și a indus răspunsul imun protector față de infecția letală cu virusul influenza. Tehnologia se extinde pentru obținerea vaccinului față de alți agenți patogeni. Administrarea intranazală a plasmidei cu ADN HSV a protejat semnificativ mucoasa orală.

Vaccinurile ADN pot fi utile în infecțiile virale la care stimularea IMC cu activarea limfocitelor Tc este esențială pentru protecție, dar administrarea vaccinului atenuat este contraindicată (persoanele imunodeficitare sau imunosupresate). Vaccinarea ADN are ca rezultat prezentarea epitopilor antigenici în asociație cu moleculele CMH I.

Vaccinarea cu ADN pare să fie sigură, prepararea este rapidă și vaccinul nu este influențat de factorul termic.

Vaccinuri obținute în plante. Plantele au fost folosite cu succes pentru a exprima gene străine și produse genice specifice. Utilitatea plantelor recombinate pentru producerea antigenelor vaccinale s-a demonstrat pentru tutun și tuberculii de cartof. În tuberculii de cartof s-au exprimat câteva Ag proteice: subunitatea B a toxinei TL de *E. coli*, Ag HBs, de rotavirus.

Nivelul expresiei proteinei la planta recombinată este adeseori scăzut, dar abordarea oferă o nouă strategie: vaccinarea este transferată funcției biologice de hrănire, care poate induce răspunsul imun al mucoaselor sau răspunsul sistemic.

Administrare. Vaccinurile virale inactivae și anatoxinele se administrează, în general, pe cale *parenterală* (subcutan, intradermic, intramuscular), în mod obișnuit în trei injecții separate la intervale de 5, 7 și respectiv 21 de zile.

Vaccinurile bacteriene vii și cele virale atenuate se administrează într-o singură doză, în general, pe cale parenterală. Vaccinul BCG, ca și vaccinul polio infecțios atenuat, la nou născuți se administrează pe cale orală.

Formularea vaccinului necesită încorporarea unui adjuvant pentru creșterea imunogenității. Adjuvanții optimizează eliberarea Ag și prezentarea, stimulează maturarea CD și induce sinteza citokinelor imunomodulatoare.

Imunitatea consecutivă vaccinării se instalează relativ lent, la circa 15–20 de zile de la ultima injecție și are o durată variabilă de la un vaccin la altul (în general, între 1 și 7 ani), scăzând treptat până la dispariția completă. Vaccinarea primară, ca și infecția, conferă organismului o stare specială de reactivitate imunitară – *memoria imunitară* – grație căreia, orice contact ulterior cu agentul patogen respectiv, realizat pe cale naturală (infecție și boală) sau pe cale artificială (prin vaccinare) declanșează o "redeșteptare" rapidă a imunității, care se manifestă cu o intensitate mai mare decât aceea a răspunsului imun postvaccinal. Cea de a II-a administrare a vaccinului declanșează o reacție anamnestică (de memorie), cu o creștere bruscă și masivă a titrului anticorpilor.

Deși în general este solidă, imunitatea postvaccinală este relativă, în sensul că unele persoane vaccinate pot totuși să facă infecția clinică într-o formă mai ușoară, mai ales consecutiv unei infecții masive cu un agent patogen deosebit de virulent.

Datorită faptului că se instalează lent, imunizarea prin vaccinare se folosește în scop profilactic pentru a evita riscul infecției cu un agent patogen.

Bibliografie

Murphy B. R., Chanock R. M. 1991. Immunization Against Viruses, în vol., Fundamental Virology, Second Edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd., New York.

Murphy B. R., Chanock R. M 1996. Immunization Against Virus Disease, în vol. Fields Virology, third Edition, ed. by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et. al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.

Bannister B., Begg N. T. 1990. Virus vaccines and antisera, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

Ada G. 1998. Vaccines, în vol. Encyclopedia of Immunology, sec. ed., ed. by Peter J. Delves, Ivan M. Roitt, AP.

Mak T. K., Saunders M.E. 2006. Vaccines and Clinical Immunization, în vol. The Immune Response. Basic and Clinical Principles Elsevier Academic Press.

Zinkernagel R.M. 2003. On Natural and Artificial Vaccination – Annu. Rev. Immunol. 21, 515–546.

Donnelly J. J., Ulmer J. B., Shiver J. W., Liu M. A. 1997. DNA Vaccines. Annu. Rev. Immunol. 15: 617–648.

Air G. M., West J. T. 2008. Antigenic Variation, în vol. Encyclopedia of Virology, third edition, Editor Brian W.

26. METODE DE STUDIU ŞI DE DIAGNOSTIC VIROLOGIC

Diagnosticul infecţiilor virale trebuie să fie rapid şi să identifice noile virusuri, multe necultivabile sau greu cultivabile.

Metodele de studiu şi de diagnostic sunt *directe* şi *indirecte*.

26.1. Metode directe

1. Examenul la microscopul electronic: *metoda coloraţiei negative, microscopia electronică în transmisie, imuno-electrono-microscopia*, pentru studiul morfologiei virale şi al etapelor ciclului de multiplicare.

2. Examenul histo-citologic la microscopul optic: observarea efectului citopatic (liză celulară, vacuolizare, sincitii, incluzii).

3. Izolarea virusului în culturi de celule, în oul embrionat de găină sau prin inocularea animalelor de laborator.

26.1.1. Metode microscopice

Microscopia electronică (ME) este singura metodă directă de studiu care vizualizează virusurile şi antigenele virale. Metoda este folosită pentru diagnosticul gastroenteritei virale, ai cărei agenţi etiologici se multiplică lent sau nu se multiplică *in vitro*, pentru analiza leziunilor tegumentare produse de virusurile herpetice, pox şi papiloma şi pentru studiul virusurilor care produc focare epidemice. Metoda a avut succes, în special pentru examinarea materiilor fecale, a leziunilor tegumentare, a concentratelor de urină, în care s-au evidenţiat virusuri care se cultivă cu dificultate: rota-, astro- şi alte virusuri mici sferice. Se poate folosi, de asemenea, pentru identificarea virusurilor izolate în cultură.

Pentru examinarea preparatelor la ME se folosesc două metode:

– *metoda coloraţiei negative*: suspensia virală se adsoarbe pe grilă de Cu şi se colorează cu un colorant electrono-dens (acid fosfotungstic sau acetat de uranil). Colorantul colorează fondul grilei, dar nu pătrunde în particulele virale intacte, care se pot astfel observa prin colorare negativă;

– examinarea *secţiunilor* tisulare sau a depozitului celular la microscopul electronic cu transmisie (TEM). Celulele sau ţesutul se fixează cu glutaraldehidă, se colorează cu tetraoxid de osmiu şi se includ în răşină Epoxy. Secţiunile ultrafine obţinute la microtom se examinează la TEM. Metoda are avantajul că detectează infecţii mixte (comune în celulele epiteliului intestinal), oferă un diagnostic rapid pentru pentru gastroenterita cu rotavirusuri şi pentru infecţiile herpetice ale tegumentului.

Dezavantaje: metoda este laborioasă şi nu permite prepararea unui număr mare de probe pentru ME; frecvent apar artefacte şi necesită expertiză pentru interpretarea imaginilor; este mai puţin sensibilă decât testele serologice pentru evidenţierea antigenelor virale sau decât metoda izolării virusului. Pentru detectarea virusului prin metoda ME sunt necesare 10^3–10^6 particule virale/ml.

Sensibilitatea metodei creşte prin centrifugarea suspensiei virale pe grilele de Cu, prin concentrarea virusului prin metoda ultrafiltrării* sau prin metoda imuno-electrono-microscopiei (IEM). În metoda IEM, grila de Cu se tapetează cu anticorpi specifici antivirali, cu rolul de a concentra virusul pe grilă.

* Ultrafiltrarea este o metodă ce utilizează membrane semipermeabile pentru separarea materialelor dizolvate şi suspendate pe baza dimensiunilor. Procesul se desfăşoară sub acţiunea presiunii negative care se aplică probei. Metoda se foloseşte pentru separarea macromoleculelor (proteine, polizaharide, lipide, polimeri sintetici) cu dimensiuni mai mici decât dimensiunile porilor membranei, virusurilor, coloizilor sau pentru concentrarea probelor diluate de acizi nucleici (1–10 nm).

CUNY HUNTER COLLEGE LIBRARY

Membranele au pori cu diametrul cuprins între 0,01–10 μm. Ultrafiltrarea nu discriminează între macromoleculele cu dimensiuni asemănătoare şi nu se foloseşte pentru separarea moleculelor care diferă cu mai puţin de un factor de 6. Pentru separarea unor astfel de molecule se folosesc tehnicile de cromatografie sau de electroforeză.

Metode histo-citologice. Examenul microscopic direct al probelor colorate histologic sau citologic poate să ofere indiciul că procesul patologic este determinat de un virus: de exemplu, incluziile nucleare evidenţiate în biopsiile de rinichi transplantat de la pacienţii cu nefrită interstiţială se datorează virusului polioma BK; schimbările citologice ale epiteliului cervixului uterin asociate infecţiei cu HPV; incluziile nucleare în celulele precursoare eritroide infectate cu parvovirusul B_{19}.

26.1.2. Metode de cultivare a virusurilor

Izolarea virusurilor prin cultivare a stat la baza progresului în virologia clinică.

Condiţii de recoltare şi transport al probelor. Unele virusuri sunt labile, fiind inactivate în câteva ore. Probele trebuie păstrate în mediu tamponat şi transportate la laborator în cel mai scurt timp, preferabil în aceiaşi zi. Pentru perioade mai lungi, probele trebuie să fie păstrate la 4°. Mediul de transport este mediul pentru culturile celulare, tamponat, cu adaus 5% ser fetal de viţel, antibiotice şi agenţi antifungici. Probele de urină pot fi plasate în mediu de transport cu 35% sorbitol.

Prezenţa virusului în probele clinice se poate demonstra prin inocularea *animalelor de laborator, a ouălor embrionate de găină* sau *în culturi de celule.*

Culturile de celule

O varietate de celule pot fi cultivate pe suportul solid de material plastic sau sticlă. Este cea mai folosită metodă pentru diagnosticul virologic.

Tipuri de culturi celulare. Cultura primară se obţine prin dispersia celulelor din ţesut, sub acţiunea enzimelor proteolitice (tripsina şi colagenaza). Culturile primare sunt diploide şi se folosesc pentru producerea vaccinurilor virale. Culturile de celule în monostrat se desprind cu enzime proteolitice şi cu agenţi chelatori (EDTA = versen) şi apoi se subcultivă în 2–3 recipiente. Durata de viaţă a celulelor diferenţiate este limitată şi variază în funcţie de tipul de celule şi de originea lor: celulele epiteliale umane pot fi subcultivate de circa 10 ori, iar fibroblastele de 40–60 de ori. Aceste culturi se numesc *linii celulare.*

Culturile celulare pot să derive din ţesuturile maligne, dar au complement cromosomal heteroploid. Astfel de culturi au o durată de viaţă nelimitată şi se numesc *linii celulare continui.* Liniile continui au pierdut inhibiţia de contact.

Inocularea probelor adecvate în linii celulare sensibile la virusul din probă, completată cu analiza microscopică a efectului citopatic (ECP), conferă metodei un grad superior de specificitate, care poate fi confirmat prin tehnica imunofluorescenţei.

Cele mai utilizate linii celulare sunt cele de rinichi de maimuţă, liniile celulare epiteliale umane în cultură continuă şi o linie de fibroblaste umane. Inocularea acestor linii permite detectarea majorităţii virusurilor cultivabile de importanţă clinică: HSV, VZV, CMV, enterovirusuri, virusul respirator sinciţial (RSV), adenovirusuri, parainfluenza, influenza şi rhinovirusuri.

Cultivarea virusului dintr-o probă clinică aduce dovada prezenţei virusului infecţios, dar antigenele virale pot persista perioade lungi de timp, după iniţierea terapiei antivirale. De exemplu, antigenele HSV-2 se detectează în tampoanele genitale un interval relativ mare, după iniţierea terapiei, când virusul nu se mai izolează.

Metoda izolării virusurilor în cultură are câteva avantaje:

– oferă posibilitatea examinării ulterioare, cu privire la sensibilitatea la agenţii antivirali sau tipizare;
– oferă informaţii epidemiologice, importante pentru sănătatea publică;
– cultivarea oferă posibilitatea identificării unor virusuri noi (de exemplu, SARS).

Majoritatea virusurilor umane cunoscute pot fi izolate şi cultivate în culturi sau prin inocularea animalelor de laborator. Izolatele de HSV se multiplică în 3 zile pe fibroblastele umane, dar pentru cele mai multe izolate clinice timpul necesar exprimării ECP sau pentru hemadsorbţie este de 7–21 zile.

Metoda cultivării nu se aplică virusurilor gastroenteritei (rotavirusuri etc.), virusurilor hepatitice, EBV, HH6, 7 şi 8, HIV, VHB şi papiloma.

Coronavirusurile se multiplică puțin în culturi celulare şi se pot izola în cultură de organe, deşi metoda nu se foloseşte în mod obişnuit.

Perfecționarea continuă a tehnicilor de cultivare a celulelor a sporit numărul virusurilor care pot fi cultivate. Descoperirea IL-2, un factor stimulator al diviziunii limfocitelor, a uşurat cultivarea celulelor limfoide, ceea ce a dus la descoperirea retravirusurilor umane.

Izolarea virusurilor în cultură este metoda cu cea mai largă utilizare pentru diagnosticul virologic.

ECP. Modificările morfologice ale celulelor infectate se observă fără colorarea celulelor, dar pentru detalii suplimentare este necesară colorarea histochimică. Coloraţia hematoxilină-eozină este cea mai adecvată.

Modificări produse de ECP :

- rotunjirea celulelor: multiplicarea virală induce modificări ale citoscheletului, care duc la rotunjire şi eventual la liza celulei;
- formarea sincițiilor: membranele celulelor adiacente fuzionează şi rezultă celule gigante cu câțiva nuclei (virusul rujeolei, VRS, HIV). Celulele sunt unite prin punți citoplasmatice (virusul herpes simplex);
- rotunjirea şi agregarea celulelor în aglomerări ciorchine, care se detaşează de suport (adenovirusuri);
- formarea incluziilor: incluziile sunt agregate nucleare sau citoplasmatice de componente ale multiplicării virale (fabrici de virus), ce se pot vedea pe preparatele colorate, la microscopul optic. Pot fi incluzii bazofile sau acidofile.

Pentru identificarea prezumtivă a izolatului, de obicei ECP este suficient. Tipul de celule în care se multiplică şi produce ECP este un indiciu pentru identificarea virusului. De exemplu, HSV se multiplică în numeroase tipuri de celule, iar CMV, numai în culturi de fibroblaste umane. De aceea, pentru izolare este necesară inocularea probei în câteva tipuri de culturi celulare.

De obicei, culturile inoculate sunt cele primare de rinichi de maimuță, de rinichi uman sau fibroblaste de embrion uman. Culturile renale pot fi înlocuite cu o linie celulară continuă (HeLa, HEp-2).

Pentru izolarea virusurilor tractului respirator, culturile inoculate se incubează la 32° sau la 37°. Unele virusuri orthomyxo- şi parainfluenza nu produc ECP evident, deşi se multiplică intens. Multiplicarea lor se evidențiază prin *metoda hemadsorbției*: hematiile adăugate pe suprafața monostratului, aderă de celulele infectate. Aderența este mediată de spiculele de HA inserate în membrana citoplasmatică.

Inconvenientul major al izolării virusurilor în cultură de celule este durata multiplicării: virusurile se pot multiplica în 1–2 zile, dar CMV necesită circa 2 săptămâni, prea mult pentru utilizare clinică.

Alt inconvenient al metodei izolării virusurilor constă în faptul că succesul depinde de obținerea probei la momentul optim. Cu cât infecția este într-o fază mai timpurie, cu atât cantitatea de virus excretată este mai mare şi şansa izolării virusului creşte. Excreția virusului, în general, scade rapid după ce efectorii RI neutralizează virusul. Alteori (de exemplu, virusurile enterice şi CMV), pot fi excretate perioade lungi – săptămâni sau luni – dar în aceste cazuri raportul etiologic cu maladia este greu de stabilit.

Pacienții imunocompromişi şi copiii infectați congenital elimină virusul pentru perioade lungi sau eliminarea devine cronică: de exemplu, o mare proporție a acestor copii excretă CMV sau virusul rubeolei în urină, prin secreția faringiană sau pe ambele căi, pentru un an. Virusul rubeolei poate fi izolat câțiva ani după naştere din cataracte sau din urechea internă a copiilor infectați congenital.

Rolul culturilor celulare convenționale pentru diagnosticul de rutină al infecțiilor virale diminuează, deoarece multe laboratoare preferă diagnosticul prin detectarea antigenului viral cu anticorpi specifici marcați cu fluorocromi sau prin detectarea genomului virusurilor de importanță clinică (CMV, VZV).

S-au elaborat metode pentru detectarea celulelor infectate cu virus, înainte ca ECP să devină aparent. Metodologia utilizării AMC marcați cu fluorocromi combină specificitatea cu posibilitatea detectării timpurii a Ag virale. AMC sunt reactivi cu specificitate înaltă şi au avantajul că pot fi folosiți pentru evidențierea antigenelor specific-virale. AMC au fost utilizați pentru diagnosticul infecției cu

CMV. CMV produce ECP vizibil după 7–10 zile, dar Ag virale imediat- timpurii (IE) şi timpurii (E) pot fi detectate în celulele infectate în 3–6 ore după infecţie, cu mult înainte de producerea ECP.

Embrionul de găină de 8–11 zile este inoculat şi incubat pentru 2–9 zile, durata variind în funcţie de virus, de calea de inoculare. Virusurile se identifică prin leziunile pustulare ale membranei corioalantoice, iar pentru testele de hemaglutinare (HA) se foloseşte lichidul amniotic sau alantoic.

Multe virusuri se cultivă în oul embrionat, dar metoda este rareori folosită: pentru evidenţierea poxvirusurilor şi pentru propagarea ortho- şi paramixovirusurilor.

Inocularea animalelor de laborator se foloseşte numai pentru arbo- şi coxsackievirusuri. Unele coxsackievirusuri de grup A se multiplică greu în cultură de celule, dar se multiplică prin inocularea intracerebrală la puii nou născuţi de şoarece. Tipul de paralizie poate fi folosit pentru identificarea grupului de coxsackievirusuri.

26.2. Metode indirecte

1. Metode *imunologice*: detectarea antigenelor virale (utilizând AMC) sau a anticorpilor specifici (virusurile sunt imunogene şi stimulează RI intens) printr-o metodă adecvată.

2. Metode *moleculare* pentru detectarea genomului viral:

– *reacţia de polimerizare în lanţ* (*Polymerase Chain Reaction* – PCR);

– *hibridizarea cu sonde moleculare* specifice pentru o secvenţă ţintă unică, pe preparate citologice/histologice.

26.2.1. Metode imunologice (serologice)

Metodele imunologice sunt folosite în virologie, cu câteva scopuri:

– pentru a identifica un virus izolat, utilizând un ser imun cu specificitate cunoscută;

– pentru demonstrarea Ag virale într-o suspensie sau în celule;

– pentru diagnosticul serologic al infecţiei virale;

– pentru testarea capacităţii imunogene a unui virus.

Proteinele structurale virale, ca şi cele sintetizate în celula infectată sunt foarte imunogene şi stimulează sinteza anticorpilor. În cursul răspunsului imun primar se sintetizează predominant IgM.

26.2.1.1. Evidenţierea anticorpilor

Toate infecţiile virale sunt însoţite de sinteza Ac, a căror evidenţiere în infecţia primară (IgM) şi în convalescenţă se face prin următoarele metode:

– reacţia de fixare a complementului (RFC);

– hemaglutinoinhibarea;

– imunofluorescenţa;

– testul IPI (imunoperoxidazei indirecte);

– seroneutralizarea;

– contra-imunoelectroforeza (CIEF);

– EIA (Enzyme linked immunosorbent assay);

– latex-aglutinarea;

– western blot (WB);

– RIA.

Determinarea IgM specific. IgM este produs timpuriu în răspunsul imun şi persistă 3–4 luni, iar IgG persistă tot restul vieţii. Detectarea IgM este dovada directă a infecţiei recente cu un anumit virus. Testele de primă generaţie ale determinării IgM au fost laborioase pentru că necesită separarea fizică a IgM de celelalte izotipuri. Având gr. mol. mai mare, IgM se poate separa de IgG prin gel-filtrare sau prin centrifugare în gradient de densitate de sucroză. Fracţiile care conţin IgM se colectează şi se testează pentru prezenţa Ac specifici antivirali, prin metodele IFA sau HAI.

Anticorpii specifici clasei IgM pot fi detectaţi prin teste imunologice, fără fracţionare prealabilă, folosind Ac anti-IgM. Anticorpii anti-IgM sunt imobilizaţi pe o suprafaţă solidă şi se pun în

contact cu serul. IgM seric este captat pe suportul solid. Metoda este mai sensibilă şi mai simplă, deoarece elimină etapa fracţionării.

Toate metodele de separare a IgM, dar mai ales metoda captării pe suportul solid, nu fac distincţia între IgM şi FR (IgM anti-Ig). FR se găseşte în serul unui procent mare de persoane adulte şi la toţi cei cu infecţii acute sau cronice. De aceea, FR se adsoarbe cu IgG agregat, pentru că altfel, rezultatele determinării IgM vor fi fals pozitive.

Alte tehnici serologice: hemaglutino-inhibarea (HAI), latex-aglutinarea şi IF (în special pentru diagnosticul (EBV). Serul este proba pentru cele mai multe metode serologice, dar secreţia salivară se poate folosi pentru detectarea Ac, în special în studiile de monitorizare la copii. De la pacienţii cu infecţii ale SNC, se poate testa lichidul cefalorahidian (LCR) pentru prezenţa Ac antivirali, iar raportul titrului Ac faţă de titrul seric oferă indicii cu privire la situsul sintezei Ac.

Pentru diagnosticul imunologic sunt necesare 2 probe de ser: una recoltată în faza acută (înainte de ziua a 7-a după infecţie) şi o probă recoltată în convalescenţă (recoltată la 1–2 săptămâni după faza acută). Cele 2 probe se testează concomitent. Creşterea de cel puţin 4 ori a titrului de Ac arată că infecţia s-a produs cu acel virus.

Metodele imunologice sunt esenţiale pentru diagnosticul şi monitorizarea acţiunii tratamentului asupra evoluţiei infecţiilor persistente: anticorpii se detectează în infecţiile persistente în condiţiile multiplicării virale (VHB, HIV, VHC).

Metodele serologice au o valoare limitată în diagnosticul infecţiilor virale la pacienţii imunocompromişi, unde virusul trebuie identificat.

Uneori Ac sunt neutralizanţi (poliovirus). Multe infecţii sunt controlate mai eficient de celulele T, iar detectarea Ac este o metodă cu importanţă secundară.

Metodele de determinare a Ac nu disting între IgG şi IgM. Diagnosticul unor infecţii virale se bazează pe seroconversie, adică pe creşterea semnificativă a titrului Ac între proba din faza acută şi cea din convalescenţă (la interval de 10–14 zile). RFC a fost folosită pe scară largă, dar lipsa de sensibilitate şi reactivitatea încrucişată a multor Ag utilizate în test a limitat utilizarea metodei în laboratorul clinic.

Diagnosticul se poate pune numai după faza acută a infecţiei.

Pentru primele 2 obiective (identificarea unui virus izolat şi demonstrarea antigenelor virale în suspensie sau în celule), se foloseşte serul specific standard. Pentru obiectivele 3 şi 4 (diagnosticul serologic şi testarea capacităţii imunogene a unui virus), probele de ser de la pacienţi se testează pentru prezenţa Ac, folosind Ag virale cunoscute.

Testele de *neutralizare* măsoară titrul de Ac care neutralizează infecţiozitatea virusului. Testul constă în diluarea serului şi incubarea diluţiilor cu o doză fixă de virus (de obicei 50% doze infecţioase) pentru 1 oră la 37° sau peste noapte la 4°. Amestecul este inoculat în culturi sensibile. Diluţia de ser care inhibă multiplicarea virusului în 50% din culturi este considerată ca fiind titrul neutralizant.

Evidenţierea antigenelor virale. Antigenele virale în suspensie (sânge, urină, fecale, suspensii tisulare) se pot demonstra prin testul imuno-enzimatic (EIA), testul latex-aglutinării sau RIA. În aceste teste, Ac specifici sunt adsorbiţi pe un suport solid (granule de plastic, godeuri, particule de latex) şi au rolul de a lega Ag din probă. Ag legat se detectează adăugând un Ac specific marcat cu o enzimă sau cu un izotop.

Metoda *latex-aglutinării pentru detectarea Ag* în fază solidă se foloseşte pe scară largă. Particulele mici de latex tapetate cu Ac specifici aglutinează în prezenţa Ag. Reacţia se observă cu ochiul liber. Metoda latex aglutinării se foloseşte pentru diagnosticul infecţiei cu rotavirusuri.

Metodele ELISA, EIA.

Principiu. Anticorpul indicator sau Ag este conjugat cu o enzimă. Prezenţa lor se detectează prin adăugarea unui substrat care este convertit la un produs colorat, sub acţiunea enzimei. Reacţia de culoare poate fi înregistrată vizual sau se măsoară spectrofotometric. Enzimele cele mai folosite sunt peroxidaza şi fosfataza alcalină, care utilizează substraturi incolore.

Metoda este larg utilizată pentru detectarea Ag de suprafaţă a HBV şi mai recent pentru detectarea proteinei C (a regiunii centrale) a virusului hepatitei C (VHC) în laboratorul de analiză a donorilor de sânge.

ELISA în faza solidă se foloseşte pe scară tot mai mare în laboratorul de diagnostic. Se folosesc Ag peptidice sintetice sau Ag recombinante, în locul lizatului viral brut. Formatul testului ELISA este foarte versatil. În esenţă, sunt comercializate 3 tipuri de teste automatizate:

1) Testul indirect: antigenul viral este imobilizat pe fază solidă. Anticorpii din ser se leagă cu antigenul şi după spălare, anticorpii sunt detectaţi cu Ig antiumană marcată. Se detectează IgG şi IgM în funcţie de Ig indicatoare. Dacă proba este pozitivă pentru FR, rezultatul poate fi fals pozitiv pentru IgM.

2) Captarea anticorpilor: Ig antiumană este fixată pe faza solidă, cu rolul de a capta IgG sau IgM din probă. Se adaugă antigenul, iar în final anticorpul marcat.

3) Testul competiţiei antigenelor: în sistemul ELISA, Ag este imobilizat, iar un Ac marcat intră în competiţie pentru legarea Ag, cu anticorpii din proba clinică.

Diagnosticul serologic al infecţiei acute (fig. 453) este indicat în cazul în care detectarea virusului este dificilă, necesită prea mult timp sau în cazurile în care asamblarea virusului a încetat (virusul hepatitei A, virusul rubeolei sau parvovirusul B_{19}).

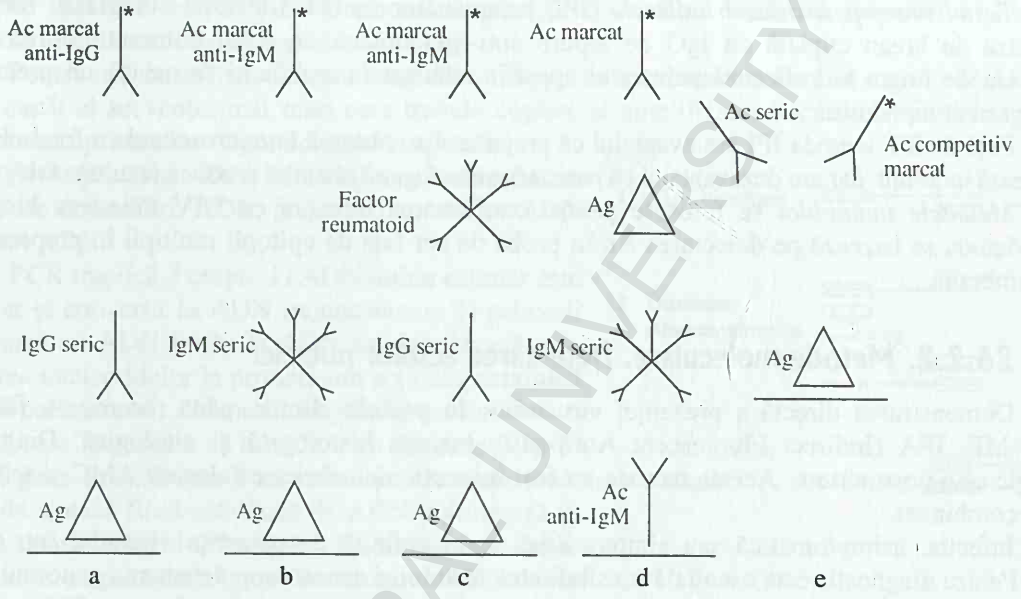


Fig. 453. Ilustrarea schematică a variantelor serologice de diagnostic viral. a. Testul indirect al detectării IgG în varianta EIA. b. Testul indirect al detectării IgM. c. Interferenţa FR în testul indirect al IgM. d. Testul captării IgM seric cu anticorpi anti-IgM. e. Testul legării competitive a Ac serici şi a Ac marcaţi. Liniile din partea de jos a schemei reprezintă suportul solid de care se leagă unul dintre reactanţi (după K. Jeffery and Emma Aarons, 2004).

Tehnicile care utilizează anticorpi marcaţi sunt imunofluorescenţa (IFA = Ac imunofluorescenţi) şi *imunoperoxidazei indirecte* (IPI), care utilizează Ac marcaţi cu peroxidază. Utilizarea IPI este uşurată de faptul că substraturile enzimei sunt etil-carbazolul şi 5-cloronaftolul, care precipită la situsul enzimei, crescând sensibilitatea metodei. Avantajul IPI este că preparatul este permanent. Pentru creşterea sensibilităţii, poate fi adăugat marcajul cu biotină, care apoi se leagă cu avidina, conjugată cu peroxidaza.

Probele (raclaj, frotiu, secţiuni fine, aspirat) pentru demonstrarea directă a antigenelor virale prin metodele IFA sau IPA se depun pe lamă de microscop şi se fixează cu acetonă rece. Virusul sau antigenul viral se detectează cu Ac marcaţi (monoclonali sau policlonali). De cele mai multe ori, Ac sunt nemarcaţi şi se detectează cu al II-lea Ac marcat (metoda indirectă) anti-catenă H.

26.1.2.2. Evidenţierea antigenelor

Detectarea antigenului prin metoda IF este o variantă rapidă de diagnostic. Iniţial s-au folosit seruri policlonale, iar ulterior AMC.

Metoda directă foloseşte ca indicator, Ac marcat, iar cea indirectă, un Ac anti-specie marcat, pentru a evidenţia Ag viral. Markerul este fluoresceina.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Metoda IF indirecte (IFI) este mai sensibilă, deoarece pe celula infectată se fixează o cantitate mai mare de marker. Rezultatele pot fi disponibile în 1–2 ore după primirea probei. Metoda se foloseşte pentru diagnosticul infecţiilor tractului respirator (cu VRS, cu parainfluenza, cu influenza A şi B), pielii, ochiului şi creierului (herpesvirusuri, adenovirusuri) şi oferă un diagnostic rapid, în câteva ore, dacă frotiul cu celule infectate se obţine repede (spălătură bronşică, sediment urinar, raclaj tegumentar sau material din biopsie). Este mai sensibilă comparativ cu metoda ME sau cu metoda inoculării în cultura de celule, în special pentru detectarea VRS. Proba ideală este aspiratul nazofaringian de la copiii cu bronşiolită, pentru care rezultatul rapid este esenţial, iar antigenele virusurilor respiratorii se exprimă pe celulele epiteliale.

Metoda IF directe permite detectarea semi-cantitativă a celulelor sanguine infectate cu CMV. Tehnica presupune separarea leucocitelor mononucleare din sânge, fixarea pe lamă şi colorarea cu AMC anti-proteina matriceală pp65 umană. Frecvenţa celulelor pozitive este indiciul infecţiei cu CMV la pacienţii imunocompromişi. Metoda este laborioasă şi necesită prelucrarea rapidă a probelor. Din aceste motive, antigenemia se determină prin metoda PCR.

Testul imunoperoxidazei indirecte (IPI), asemănător cu IFI, foloseşte complexul format din peroxidaza de hrean cuplată cu IgG de iepure anti-IgG umană, în locul colorantului fluorescent. Peroxidaza de hrean hidrolizează substratul specific adăugat în reacţie şi formează un precipitat la locul legării complexului.

Faţă de IFI, metoda IPI are avantajul că preparatul se observă la microscopul cu fond clar, lama se păstrează indefinit, dar are dezavantajul că *peroxidaza endogenă* poate să producă rezultate fals pozitive.

Metodele imunoblot se folosesc pentru confirmarea infecţiei cu HIV (Western blot) şi cu HCV. Metoda se bazează pe detectarea Ac în proba de ser faţă de epitopii multipli în preparatul blot pe o membrană.

26.2.2. Metode moleculare. Detectarea acizilor nucleici

Demonstrarea directă a prezenţei virusurilor în probele clinice, până recent, s-a făcut prin metoda ME, IFA (Indirect Fluorescent Antibody), metoda histologică şi citologică. Diagnosticul histologic este postmortem. Aceste metode au fost înlocuite de cele care folosesc AMC şi tehnologia ADN recombinant.

Infecţia, asimptomatică sau simptomatică, este definită de prezenţa virusului într-o probă clinică. Pentru diagnostic este esenţială sensibilitatea testului şi are ca scop detectarea genomului viral. Un test calitativ sensibil este relevant pentru diagnosticul HIV la copii, sub forma ADN proviral în leucocitele periferice sau al infecţiei cu HCV, sub forma ARN seric.

Diagnosticul rapid al infecţiilor virale se realizează prin metodele care utilizează ADN recombinant şi de amplificare moleculară, care oferă rezultate calitative şi cantitative, cu o sensibilitate superioară celorlalte metode.

Tehnicile ADN recombinant permit demonstrarea acidului nucleic viral în probele analizate, ca o alternativă la detectarea Ag virale. Tehnica este adecvată virusurilor al căror genom se integrează în ADN celular sau persistă sub forma genomului viral episomal. Expresia genelor papiloma este foarte limitată şi infecţia nu poate fi diagnosticată prin metodele de detectare a Ag. ADN viral se evidenţiază prin hibridizarea dot-blot sau hibridizare *in situ*.

Principiu. Metoda hibridizării *dot-blot* şi *in situ* se bazează pe principiul conform căruia AN monocatenar se va renatura cu catenele complementare obţinute prin tehnologia ADN recombinant.

În metoda *hibridizării dot-blot*, AN este extras din celule (ţesut) şi imobilizat pe filtru de nitroceluloză sau nylon. ADN este foarte stabil şi rezistent la tratamente dure cu 0,3 M NaOH la 60°, folosite pentru eliberarea ADN de proteine, de ARN şi de membranele celulare, în probele clinice. Se adaugă proba, selectată pentru o regiune specifică a AN viral, care se va alinia cu catenele complementare, timp de circa 6 ore. Proba poate fi marcată cu un radioizotop, cu biotină sau cu coloranţi fluorescenţi (DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole), care se colorează albastru sau cu acetyl aminofluorene (AAF), ce se colorează roşu la lumina uv. Legarea probei marcate de AN se evidenţiază ca o pată neagră pe membrană. Metoda detectează până la circa 10.000 copii de AN viral.

Hibridizarea *in situ* se foloseşte pentru evidenţierea AN viral, direct în secţiunea tisulară.

Până acum, metoda a fost folosită în special pentru virusurile cu genom ADN. ARN este denaturat prin metodele de extracţie şi este mai sensibil la atacul nucleazei decât ADN. Tehnica se foloseşte pentru diagnosticarea infecţiilor cu HPV, ce nu pot fi cultivate, iar expresia Ag în ţesutul infectat este foarte limitată şi pentru diagnosticul infecţiilor cu herpesvirusuri, mult mai rapidă decât metoda izolării în cultura de celule.

Metoda hibridizării AN nu este la fel de sensibilă ca metoda detectării Ag, deoarece în ciclul multiplicării se sintetizează mai puţine molecule de AN decât proteine. Acest neajuns a fost eliminat prin metoda PCR. Avantajul major al metodei este că Taq ADN-polimeraza izolată din bacteria *Thermus aquaticus* este rezistentă la temperatură, ceea ce permite succesiunea ciclurilor de denaturare a ADN şi alungirea primerilor, ceea ce produce o amplificare de până la 1 million de ori a segmentelor de ADN. PCR poate să detecteze un singur genom viral într-o suspensie celulară sau în secţiune tisulară.

PCR (Reacţia de polimerizare în lanţ) este o metodă simplă şi rapidă de a copia şi a amplifica secvenţele specifice de ADN cu lungimea de până la 1 kb. Este o tehnică preparativă şi analitică folosită în toate domeniile biologiei moleculare.

Pentru utilizarea metodei este necesară cunoaşterea secvenţei unei scurte regiuni de ADN de la fiecare capăt al secvenţei mai mari care trebuie copiată şi amplificată. Secvenţele scurte se folosesc pentru sinteza primerilor oligonucleotidici specifici.

Principiu (fig. 454). Metoda constă din cicluri repetate ale denaturării ADN, reasocierii catenelor ADN şi sintezei ADN.

PCR implică 3 etape: 1) ADN dublu catenar este denaturat şi convertit la ADN monocatenar; 2) primerii se asociază cu ADN ţintă; 3) ADN se sintetizează prin adăugarea nucleotidelor la primeri sub acţiunea catalitică a ADN-polimerazei. Primerii oligonucleotidici au o secvenţă care le permite să hibrideze cu capetele 3' şi 5' ale unei gene ţintă. Primerii se extind pe secvenţa ţintă, reacţia de sinteză fiind catalizată de ADN-polimerază în prezenţa deoxinucleotid-trifosfaţilor. Rezultatul este duplicarea secvenţei ţintă de origine. Denaturarea ADN dublu catenar rezultat după primul ciclu şi repetarea procesului de multe ori produc creşterea exponenţială a cantităţii de ADN ţintă.

ADN dublu catenar care conţine secvenţa ce urmează a fi copiată şi amplificată, se amestecă cu un mare exces molar a două oligonucleotide de ADN monocatenare – *primerii*.

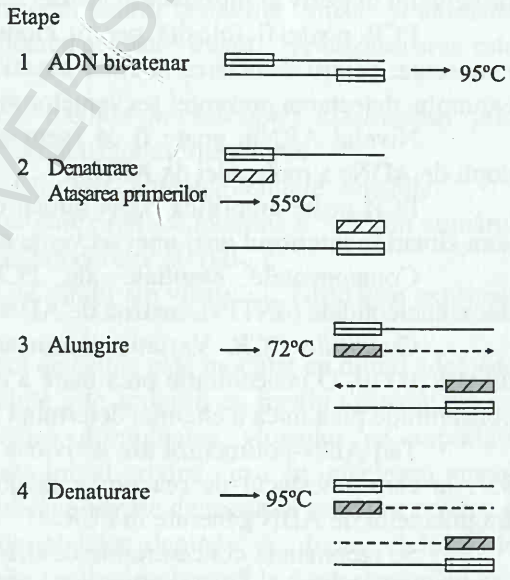


Fig. 454. Ilustrarea schematică a principiului şi etapelor tehnicii PCR (după K. Jeffery and Emma Aarons, 2004).

Primul primer este identic cu secvenţa capătului 5' al catenei sens al ADN ce va fi copiat, iar al II-lea primer este identic cu secvenţa de la capătul 3' al catenei opuse. Pentru că ADN dc este antiparalel, al II-lea primer este complementul inversat al catenei sens.

Reacţia de polimerizare în lanţ este iniţiată prin denaturarea ("topirea") ADN la temperatură înaltă şi răcirea amestecului pentru a permite reasocierea şi formarea dublei catene. În timpul reasocierii, primul primer, prezent în mare exces molar, va hibrida la capătul 5' al catenei sens, iar al II-lea primer, de asemenea prezent în mare exces molar, va hibrida cu capătul 3' al catenei antisens.

Amestecul reasociat pe baza complementarităţii bazelor se incubează cu ADN polimeraza I şi cu toate cele 4 deoxinucleotid-trifosfaţi (A, T, G şi C). Se sintetizează ADN nou: ADN polimeraza I va extinde capătul 3' al fiecărui primer legat şi se sintetizează complementul matriţei de ADN monocatenar.

Catena sens originală are rolul de matriţă pentru sinteza unei noi catene antisens, iar catena antisens originală are rolul de matriţă pentru sinteza unei noi catene sens. Cu aceasta se încheie ciclul I al reacţiei de polimerizare.

Ciclul II al reacției este inițiat după ce amestecul de reacție este denaturat din nou și catenele, atât cele originale, cât și cele sintetizate în ciclul I, se aliniază cu primerii. În treapta de sinteză a ADN din ciclul II, fiecare lanț sintetizat în primul ciclu, dar și catenele originale au rol de matriță după ce au hibridat cu primerii adecvați. Numărul matrițelor în reacție se dublează la fiecare ciclu și de aici derivă numele de "reacție în lanț".

Ciclul al II-lea al reacției se încheie când ADN-polimeraza I extinde primerii și sintetizează catene complementare matrițelor.

Reacția de polimerizare poate fi condusă pentru 20 sau un număr mai mare de cicluri.

Teoretic, fiecare rund de replicare dublează numărul moleculelor de ADN, dar procesul rareori are eficiență de 100% datorită prezenței inhibitorilor ADN-polimerazei, care în rundurile ulterioare limitează randamentul reacției.

Reacțiile sunt automatizate, folosind termocicluri cu temperatură controlată pentru reglarea denaturării, reasocierii și sintezei ADN. Se utilizează Taq-polimeraza (o ADN polimerază I) care suportă temperatura de denaturare a ADN, izolată de la bacteriile termofile.

Reacția de polimerizare în lanț are multe utilizări. De exemplu, folosind primerii adecvați poate fi amplificată orice secvență de ADN. După amplificare, ADN poate fi legat într-un vector adecvat și astfel secvența ADN se determină fără să necesite izolarea genei ADN. Acesta a fost principalul obiectiv al introducerii acestei metode.

PCR poate fi folosită pentru clonarea genelor cunoscute sau a genelor înrudite cu genele cunoscute; pentru detectarea și chiar cuantificarea unei secvențe particulare de ADN într-o probă (de exemplu, detectarea prezenței secvențelor virale într-o probă clinică).

Nivelul ARNm poate fi de asemenea cuantificat după transcrierea inversă și obținerea unei copii de ADNc a moleculei de ARNm.

PCR poate amplifica ADN numai când cei doi primeri sunt apropiați unul de celălalt (adică sunt situați în interiorul unei unei secvențe de 1 kb).

Componentele esențiale ale PCR sunt: Taq ADN-polimeraza, primerii oligomerici, deoxinucleotidele (dNTPs), matrița de ADN și ionii de Mg.

Condițiile PCR. Variația recomandată a concentrației Taq ADN-polimerazei este 1,0–2,5 unități/100 µl. O concentrație prea mare a enzimei favorizează formarea produselor nespecifice, iar o concentrație prea mică a enzimei determină formarea unei cantități insuficiente de produs.

Taq ADN-polimeraza are activitate optimă la 70° și nu este inactivată la temperatura de 90–95°, la care amestecul de reacție se incubează pentru scurte intervale de timp pentru denaturarea fragmentelor de ADN generate în PCR.

Se recomandă concentrațiile de 0,1–0,5 µM ale primerilor. Concentrațiile mai mari de primer pot favoriza formarea produselor nespecifice și în special pot crește rata asocierii primer-dimer. Produsele nespecifice și artefactele primer-dimer sunt substraturi pentru PCR și rezultatul este scăderea cantității de produs specific.

Primerii tipici au o lungime de 18–28 nucleotide, cu o proporție de G + C de 50–60%. Primerii trebuie să aibă temperaturi asemănătoare de denaturare (Tm).

Concentrațiile dNTP care dau specificiate și fidelitate optimă sunt de 20–200 µM, iar a ionilor de Mg, de 0,5–2,5 mM.

PCR presupune un ciclu repetitiv între o temperatură înaltă necesară denaturării ADN, o temperatură relativ scăzută pentru a permite primerilor să se hibrideze cu regiunea complementară a ADN și o temperatură intermediară pentru extensia primerilor. Reglarea temperaturii și durata de timp a fiecărui interval depind de compoziția în baze, lungimea și concentrația primerilor. Temperatura de hibridare de 55–72° dă cele mai bune rezultate. La o concentrație de 0,2 µM, hibridarea necesită numai câteva secunde.

Activitatea enzimei variază cu două ordine de mărime între 20 și 85° C. Extensia primerilor are loc la 72°, optimă pentru Taq ADN-polimerază.

Condițiile tipice pentru denaturare sunt la 94–95°, pentru 30–60 secunde. Temperaturile inferioare pot da o denaturare incompletă a matriței și/sau a produsului de reacție. O denaturare la o

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

temperatură prea înaltă sau prelungită prea mult, duce la pierderea activității enzimei. Timpul de înjumătățire a activității Taq ADN-polimerazei este de 40 min. la 95°. Un număr prea mare de cicluri de reacție poate crește cantitatea și complexitatea produselor nespecifice, iar un număr prea mic de cicluri furnizează o cantitate prea mică de produs final.

Alegerea corectă a primerilor este foarte importantă. Trebuie cunoscută secvența genomului cel puțin a unei regiuni, iar primerii trebuie să țintească o regiune bine conservată.

Produsul reacției de amplificare are dimensiuni cunoscute și poate fi detectat pe gel de agaroză, în comparație cu o scară de greutăți moleculare cunoscute. În produsul de amplificare se poate evidenția mai mult decât o bandă sau banda nu are localizare corectă.

26.3. Cuantificarea multiplicării virale

Metode fizice. PCR (metodă bazată pe detectarea acizilor nucleici) poate să determine numărul copiilor genomice ale virionilor infecțioși și neinfecțioși într-o probă.

Testele *serologice* – RIA și ELISA – pot să determine cantitatea de virus dintr-o probă. Aceste metode nu disting între particulele infecțioase și neinfecțioase și uneori detectează proteinele virale neasamblate.

Unele virusuri posedă o proteină cu funcție *aglutinantă* pentru hematiile umane și animale. Testele de HA sunt metode ușoare și rapide pentru cuantificarea acestor virusuri. Hemaglutinarea este produsă de virionii infecțioși și neinfecțioși.

Numărul de virioni poate fi evaluat direct prin metoda *microscopiei electronice*, prin comparație cu o suspensie standard de particule de latex de dimensiuni asemănătoare.

Metodele biologice se bazează pe inocularea animalelor sau culturilor celulare sensibile:

- determinarea *dozei letale 50* (DL_{50}) (doza de virus care produce moartea a 50% din numărul total de animale infectate) sau determinarea *dozei infecțioase* 50 (DI_{50});
- determinarea *ECP* în culturi de celule la o serie de diluții ale virusului. Titrul este exprimat în DI_{50};
- metoda *plajelor* este cea mai folosită. Monostratul de celule este inoculat cu diluții adecvate de virus. După adsorbția virusului, stratul de celule este acoperit cu mediu agarizat sau cu carboxi-metilceluloză (CMC) pentru a împiedica diseminarea virusului pe suprafața monostratului. După câteva zile, celulele infectate inițial produc virus ce infectează numai celulele învecinate. Ciclurile succesive de multiplicare urmate de moartea celulelor produc o plajă de liză. Durata de timp până la apariția plajelor depinde de durata ciclului de multiplicare a virusului și variază de la câteva zile (poliovirus), până la două săptămâni sau mai mult (SV_{40}). În condiții controlate, o plajă de liză poate să rezulte prin multiplicarea unei singure particule virale, denumită *UFP*. Plajele pot fi numărate macroscopic. Raportul numărului de particule infecțioase față de numărul total de particule virale variază de la 1 la mai mult de 1/1000, cu o medie de 1/câteva sute;
- unele virusuri (herpes, vaccinia) formează *pustule* pe membrana corioalantoică a embrionului de găină. Ele pot fi cuantificate prin raportarea numărului de pustule calculat la diluția virusului inoculat.

26.4. Purificarea și identificarea virusurilor

În vederea purificării, virusul se cultivă într-un substrat celular permisiv sau se inoculează la gazde sensibile pentru obținerea unei cantități mari de virus.

Prima treaptă a purificării este *concentrarea* particulelor virale. Concentrarea se face prin metoda precipitării cu sulfat de amoniu, etanol sau PEG sau prin metoda ultrafiltrării.

Pentru concentrarea virusurilor hemaglutinante se folosește metoda *hemaglutinării*, urmată de *eluția* virusului.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Odată concentrat, virusul poate fi separat de materialele probei prin centrifugare diferențială, centrifugare în gradient de densitate, cromatografie în coloană şi electroforeză.

Pentru o purificare adecvată este necesară mai mult decât o etapă. Purificarea preliminară are scopul de a îndepărta cel mai mult material neviral, prin centrifugare. Treapta finală include totdeauna centrifugarea în gradient de densitate.

Virusurile pot să fie purificate prin centrifugare la viteză înaltă în gradiente de densitate de clorură de cesiu, tartrat de potasiu, citrat de potasiu sau sucroză.

Cantități mici de material celular tind să se adsoarbă pe particulele virale şi să co-purifice. Criteriul minim de puritate este aspectul omogen la microscopul electronic.

Identificarea unei particule ca virus se face pe baza următoarelor principii:

- particula poate fi obținută numai din celule sau din țesuturi infectate;
- particulele obținute din diferite surse sunt identice, indiferent de substratul în care se cultivă;
- inactivarea infecțiozității sub acțiunea factorilor fizici sau chimici este asociată cu pierderea activității virale;
- serul imun anti-virus infecțios reacționează cu particulele virale;
- pasajul particulelor în cultura celulară permisivă duce la producerea virusului progen.

26.5. Acţiunea factorilor fizici şi chimici asupra virusurilor

Reacția la temperatură este foarte diferită: virusurile icozaedrice nude tind să fie stabile, pentru că pierd puțin din infecțiozitate după câteva ore la 37°. Virusurile învelite sunt mai temosensibile: titrul infecțios scade rapid la 37°.

Infecțiozitatea virală, în general, este anulată la 50–60° pentru 30 min. Excepțiile sunt VHB, poliomavirusurile.

Virusurile pot fi conservate la temperaturi sub-îngheț şi unele suportă liofilizarea (înghețarea prin uscare) şi pot fi păstrate în stare uscată la 4° sau la temperatura camerei. Virusurile care suportă liofilizarea sunt mai termorezistente, dacă sunt supuse încălzirii în stare uscată. Virusurile învelite pot să-şi piardă infecțiozitatea după păstrare prelungită la –90° şi sunt foarte sensibile la îngheț-dezgheț repetat.

Multe virusuri pot fi *stabilizate* cu săruri ($MgCl_2$, $MgSO_4$, Na_2SO_4), la concentrația de 100 moli/L şi astfel îşi păstrează infecțiozitatea prin încălzire la 50° timp de o oră. Mecanismele prin care sărurile stabilizează preparatele virale, nu se cunosc, dar efectul este important pentru prepararea vaccinurilor.

Virusurile sunt stabile la pH cuprins între 5 şi 9. Enterovirusurile sunt rezistente la condițiile acide. Toate virusurile îşi pierd infecțiozitatea în mediul alcalin.

Radiațiile uv, x şi particulele cu energie înaltă inactivează virusurile. Doza inactivatoare variază la diferite virusuri.

Detergenții neionici (Nonidet, P_{40} şi Triton x-100) solubilizează constituienții lipidici ai peplosului, iar proteinele sunt eliberate fără a fi denaturate. Detergenții anionici (SDS) solubilizează învelişul şi sparg capsida în polipeptide distincte.

Formaldehida anulează infecțiozitatea virală, prin reacția cu acizii nucleici dar are efecte adverse minime asupra antigenității proteinelor. Virusurile cu genom monocatenar sunt inactivate mai uşor decât cele dublu catenare. De aceea, formaldehida a fost adeseori folosită pentru producerea vaccinului inactivat. Antibioticele şi sulfonamidele nu acționează asupra virusurilor.

Compuşii quaternari ai amoniului nu au activitate antivirală, ca şi compuşii organici cu iod. Concentrații mai mari de clor sunt necesare pentru inactivarea virusurilor, în special în prezența proteinelor străine. De exemplu, tratamentul cu clor al fecalelor pentru inactivarea bacililor tifici, este inadecvată pentru a inactiva virusul polio.

Inactivarea virusurilor se face în scopul sterilizării laboratorului şi echipamentelor sau pentru dezinfectarea suprafețelor şi a tegumentului, pentru dezinfectarea apei şi pentru producerea vaccinului viral inactivat.

Sterilizarea se poate realiza cu vapori de apă sub presiune, cu căldură uscată, oxid de etilenă, iradiere gama. Suprafețele se dezinfectează cu hipoclorit de sodiu, glutaraldehidă, formaldehidă, acid

peracetic. Tegumentul se dezinfectează cu clorhexidină, etanol 70% şi iodofori. Pentru producerea vaccinurilor se foloseşte formaldehida, β-propiolactona, psoralenul asociat cu radiația uv sau cu detergenți.

Bibliografie

Jeffery K., Pillay D. 2004. Diagnostic Approaches – în vol. Principles and Practice of Clinical Virology, 2004, fifth Edition, ed. Arie J. Zuckerman, Jangu E. Banatvala, John R. Pattison, Paul D. Griffith, Barry D. Schoub, John Wiley & Sons, Ltd.

Kangro H. O. 1990. The Diagnosis of Virus Infections, în vol. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity,8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier.

McIntosh K. 1990. Diagnostic Virology, în vol. Virology, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press, Ltd, New York.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

27. CHIMIOTERAPIA INFECŢIILOR VIRALE

> If it were not for the great variability among individuals, medicine might as well be a science and not an art (sir William Osler, 1892).

Chimioterapia s-a impus ca metodă de tratament a infecţiilor virale care nu beneficiază de vaccin. Cei mai simpli agenţi infecţioşi sunt cel mai greu de controlat.

Condiţia majoră a unui compus antiviral este *selectivitatea*. Inhibitorii multiplicării virale nu trebuie să producă efecte toxice asupra celulelor, ţesuturilor şi organelor gazdei. Dificultatea majoră în calea găsirii unor agenţi antivirali, se datorează incapacităţii agenţilor chimici de a discrimina între mecanismele multiplicării virale şi procesele de biosinteză celulară. Discriminarea acestor procese nu este posibilă în totalitate, deoarece moleculele specific virale sunt sintetizate de aparatul celular: ribosomii şi enzimele sintezei proteice. Din această cauză, chimioterapia infecţiilor virale rămâne o problemă majoră a cercetării biomedicale. Insuccesele terapiei infecţiilor virale, comparativ cu succesele terapiei infecţiilor bacteriene, se datorează diferenţelor fundamentale între bacterii şi virusuri: bacteriile sunt organisme autonome, cu metabolism propriu, iar virusurile sunt entităţi cu organizare acelulară, care interacţionează cu substratul celular viu într-o modalitate specifică, prezentând un *parazitism absolut, de nivel genetic*, neîntâlnit la bacteriile parazite. Studiile de biologie moleculară identifică funcţiile specific virale ce pot servi ca ţinte pentru acţiunea agenţilor chimioterapeutici: ataşarea, dezvelirea, sinteza acizilor nucleici virali, traducerea, asamblarea şi eliberarea virusurilor. În contrast cu infecţiile bacteriene, la care semnele şi simptomele maladiei însoţesc multiplicarea bacteriană, în cazul infecţiilor virale, simptomele clinice apar numai după o perioadă de incubaţie adecvată, timp în care multiplicarea virală atinge o rată maximă (Topley şi Wilson's, 1990). De aceea, terapia instituită la apariţia semnelor clinice ale infecţiei virale va fi tardivă. S-au identificat totuşi, molecule specifice multiplicării virale şi agenţi chimici care interferă cu aceste molecule şi inhibă multiplicarea virală. Activitatea antivirală a unui compus, demonstrabilă *in vitro*, nu este suficientă pentru a-l utiliza în clinică. Introducerea în clinică a unui agent antiviral este rezultatul unor studii preclinice foarte laborioase.

Agenţii antivirali trebuie să îndeplinească anumite condiţii:

- să prezinte specificitate pentru un ţesut sau organ ţintă, în care este localizată infecţia virală;
- să nu fie toxici pentru celule;
- să fie activi atât intra-, cât şi extracelular;
- să fie stabili din punct de vedere metabolic.

Pentru virusurile care formează plaje de liză în monostratul celular, reducerea numărului de plaje sub acţiunea agentului antiviral este testul edificator esenţial al potenţialului său antiviral. Activitatea antivirală este definită de concentraţia inhibitorului care reduce cu 50% numărul plajelor de liză. Reducerea randamentului multiplicării oferă de asemenea informaţii utile, folosind diferite multiplicităţi de infecţie.

Foarte puţine infecţii virale beneficiază de tratamentul chimioterapic: cele produse de *herpesvirusuri* (herpes simplex şi virusul *zona zoster*), infecţia cu *HIV* şi infecţia cu *virusul influenza*. Cele mai bune ţinte pentru inhibiţia cu agenţi antivirali sunt molecule care îndeplinesc o *funcţie specific virală* şi care nu au corespondent în celula gazdă. Pentru a identifica moleculele specific virale cu care pot interacţiona agenţii antivirali, este importantă caracterizarea moleculară a virusului, structura genomului, dar este necesară cunoaşterea evenimentelor moleculare ale multiplicării

SOUTHERN UNIVERSITY LIBRARY

virusului. Toate treptele multiplicării virale sunt ţinte potenţiale pentru acţiunea agenţilor antivirali, dar evenimentele timpurii (*ataşarea, penetrarea, dezvelirea*), *sinteza acizilor nucleici şi a proteinelor specific virale, asamblarea şi eliberarea* se aseamănă cu procesele celulare normale şi sunt catalizate, adeseori, de enzime celulare.

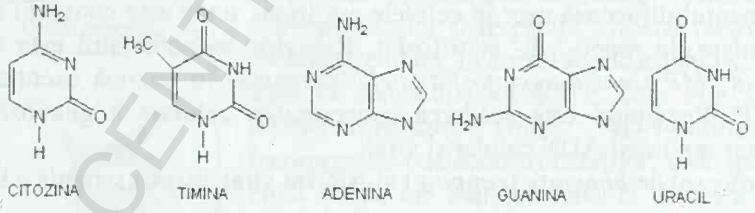
27.1. Analogii nucleozidelor

Sinteza *acizilor nucleici* virali este una dintre ţintele predilecte ale agenţilor antivirali, pentru că se deosebeşte de sinteza acizilor nucleici celulari şi este catalizată de enzime specific virale: *polimerazele ce catalizează sinteza ADN sau ARN viral şi kinazele* care fosforilează nucleozidele sunt ţinte pentru agenţii chimioterapeutici antivirali. Funcţiile acestor enzime sunt adeseori inhibate selectiv de agenţii antivirali, la concentraţii semnificativ mai mici decât cele inhibitoare pentru enzimele omologe ale celulei gazdă. *Timidin-kinazele* catalizează *fosforilarea C5' al pentozei,* prima treaptă a sintezei nucleozidelor pirimidinice (timidina, citidina), pentru a fi încorporate în ADN. *Nucleozid-kinazele* şi *polimerazele ADN* sunt codificate de gene virale şi de gene celulare. Proprietăţile lor diferă foarte mult în ceea ce priveşte specificitatea de substrat, afinitatea de legare şi sensibilitatea faţă de diferiţi compuşi chimici. Pe aceste diferenţe se bazează utilizarea *analogilor nucleozidelor* chimici în terapia antivirală. Analogii nucleozidelor inhibă replicarea acizilor nucleici prin inhibiţia activităţii polimerazelor virale. Unii analogi sunt încorporaţi în molecula de acid nucleic şi blochează creşterea catenei moleculare. Cei mai eficienţi analogi inhibă specific activitatea polimerazelor virale, având efect minim asupra polimerazelor celulare. Variantele virale rezistente apar, uneori cu rapiditate. Administrarea combinaţiei de medicamente întârzie apariţia fenomenelor de rezistenţă.

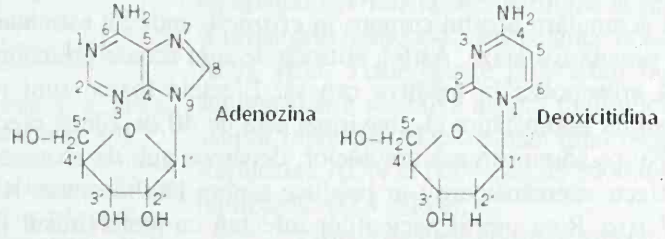
Analogii nucleozidelor sunt fosforilaţi de nucleozid-kinazele virale şi celulare şi sunt încorporaţi în catene ADN de către ADN- polimeraze, intrând astfel în competiţie cu nucleozidele naturale (Bryant, 2001). Analogii vechi ai nucleozidelor (idoxuridina, trifluorotimidina, vidarabina) sunt relativ toxici pentru organismul uman.

Idoxuridina şi *trifluorotimidina* se leagă cu afinitate egală de chinazele virale şi celulare, dar sunt inhibitori mai buni ai ADN-polimerazelor virale. Efectul lor este scăderea ratei de sinteză a ADN în celulele infectate şi neinfectate. Administrarea sistemică a idoxuridinei pacienţilor cu encefalită herpetică, nu a scăzut riscul de deces, iar mielosupresia este accentuată la aproape toţi indivizii trataţi. Insă, compusul este mult mai eficient şi are o toxicitate mult mai scăzută atunci când este administrat local (în keratite herpetice).

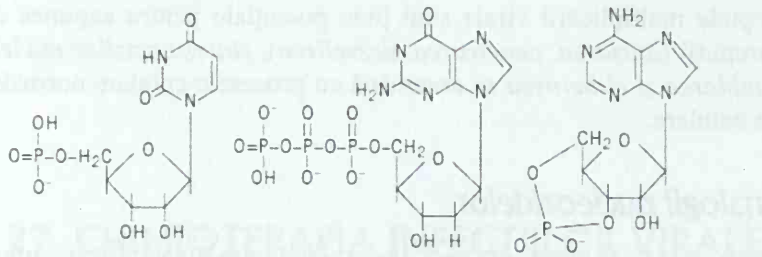
Vidarabina este analogul adenozinei. S-a sintetizat şi s-a studiat ca agent antitumoral.



Structura moleculară a bazele azotate componente ale acizilor nucleici. Caracterul aromatic al inelelor purinice şi pirimidinice face ca nucleotidele să absoarbă lumina UV cu spectre caracteristice, ceea ce permite detectarea, identificarea şi quantificarea nucleotidelor şi a derivaţilor lor.

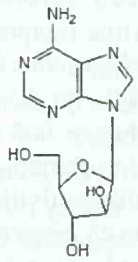


Structura moleculară a nucleozidelor

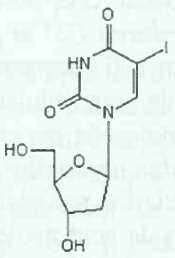


Uridin 5' - monofosfat (UMP) | Deoxiguanozin 5' - trifosfat (dGTP) | Adenozin 3', 5' - monofosfat (AMP ciclic)

Structura moleculară a nucleotidelor



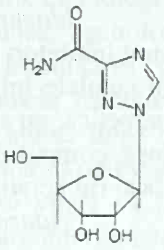
Structura moleculară a vidarabinei



Structura moleculară a idoxuridinei

Ulterior s-a evidențiat că vidarabina este activă față HSV, VZV, CMV, virusul vaccinal şi unele retravirusuri tumorale. Mecanismul de acțiune implică fosforilarea nucleozidului de către enzimele celulare şi încorporarea în catena de ADN viral şi celular, în curs de sinteză, rezultatul fiind încetinirea ratei sintezei ADN. Vidarabin-trifosfatul este un inhibitor competitiv al ADN-polimerazei celulare şi virale. Este mai activ față de enzimele virale, ceea ce face să aibă efect inhibitor selectiv față de sinteza ADN viral. Vidarabina inhibă şi alte trepte ale sintezei acizilor nucleici: poliadenilarea ARN şi deoxinucleotidil-transferaza terminală; inhibă o enzimă de metilare a ARNt şi ARNm. Acest efect face ca vidarabina să fie toxică pentru celulele mononucleare. Se foloseşte ca unguent ocular pentru tratamentul cheratitei herpetice. Pentru tratamentul infecțiilor herpetice prin administrare intravenoasă, vidarabina a fost înlocuită de acyclovir, datorită slabei solubilități în apă şi toxicității relativ ridicate.

Ribavirina, un analog sintetic al nucleozidelor purinice (1-β-D-ribofuranozil-1,2,4-triazol-3-carboxiamida), a fost sintetizată la începutul anilor '70. Din punct de vedere structural, se aseamănă cu guanozina şi inozina. *In vitro* este activă față de o gamă foarte variată de virusuri ADN şi ARN: adeno-, herpes-, influenza A şi B, virusul respirator sincițial, bunya-, arena-, reo- şi HIV.



Structura moleculară a ribavirinei

S-au propus trei mecanisme de acțiune, ceea ce explică spectrul său larg de activitate.

a) Medicamentul difuzează uşor în celulele eucariote, unde este convertit de către enzimele celulare, la mono-, di- şi trifosfat. Ribavirin-monofosfatul este un *inhibitor puternic al IMP (inozin-monofosfat) dehidrogenazei*, o enzimă esențială pentru sinteza GTP. Rezultatul este scăderea concentrației celulare a guanozin-nucleotidului, necesar replicării ADN celular şi viral;

b) Inhibă procesul de *bonetare* (*capping*) al ARNm viral, etapa esențială a traducerii mesajului în proteine virale;

c) Inhibă direct *ARN-polimeraza* dependentă de ARN a virusurilor influenza şi întârzie inițierea şi alungirea copiilor de ARNm.

Ribavirina nu este încorporată în structura acizilor nucleici şi nici nu determină terminarea transcrierii ARNm. Ribavirina este toxică: produce anemie şi este embriotoxică. Anemia apare ca o consecință a difuziei şi acumulării acestui compus în *eritrocit*, unde nu este inactivat prin defosforilare, deoarece eritrocitul nu posedă fosfataze. Astfel, eritrocitele sunt scoase prematur din circulație. La doze mari, ribavirina inhibă eritropoeza în măduva osoasă. Efectele toxice sunt reversibile după oprirea tratamentului, dar timpul de înjumătățire al ribavirinei este de 40 de zile şi efectele se prelungesc după oprirea tratamentului. Nu se administrează gravidelor, deoarece puii de şoarece se nasc cu malformații scheletice şi probabil efecte asemănătoare s-ar produce asupra fătului uman. Ribavirina se foloseşte în tratamentul *febrei de Lassa*. Rata morții pacienților infectați cu arenavirusul febrei de Lassa este de 55–76%, dar scade la 5–9% la cei tratați. Ribavirina se administrează chiar profilactic la cei cu risc mare

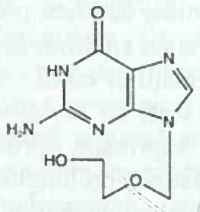
BUCUREŞTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

pentru febra de Lassa. Febra de Lassa este o infecție hemoragică, produsă de un arenavirus, răspândită prin urina rozătoarelor infectate, în ariile endemice (în Africa de vest) și adeseori este fatală. După o săptămână de febră și complicații nespecifice, apare hemoragia, în special în tractul gastro-intestinal și chiar moartea prin șoc hipovolemic. Febra hemoragică cu sindrom renal este cauzată de virusul Hantaan (un bunyavirus), transmis prin urina rozătoarelor.

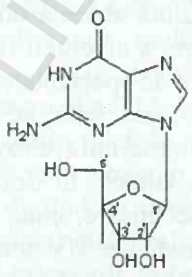
Medicamentul traversează bariera hemato-encefalică și în lichidul cerebrospinal realizează concentrații de 50–100% din cele serice. De aceea se folosește pentru tratamentul *encefalitelor*. În 1986 a început administrarea sub formă de aerosoli pentru tratamentul infecțiilor cu virusul respirator sincițial.

Analogii nucleozidici utilizați în prezent în chimioterapia antivirală, sunt mai puțin toxici: *acyclovir* este activat numai în celulele infectate de virus, iar *zidovudina* inhibă reverstranscriptaza, enzimă absentă în celulele normale ale organismului.

Acyclovir cunoscut sub denumirea comercială de *zovirax* (9-(2-hidroxietoximetil) guanina), are cel mai bun index terapeutic dintre toți agenții antivirali în uz și este intens utilizat pentru tratamentul infecțiilor cu virusul *herpes simplex* (Gold și Corey, 1986). A fost descoperit în anii '70 de către Elion și colab., într-un screening pentru compuși cu activitate antivirală. Din punct de vedere chimic, este un analog structural al *guanozinei*, care în locul *ribozei*, la baza azotată este atașată *o catenă laterală neciclică*. Acyclovir inhibă multiplicarea HSV-1, HSV-2, VZV, cu toxicitate minimă pentru celulă. Este mai puțin eficient față de EBV, CMV sau HH-6 (Acosta și Balfour, 2001). Selectivitatea acțiunii sale față de virusurile herpetice derivă din faptul că este activată numai în celulele infectate, fiind fosforilată la ACV-monofosfat de timidin-kinaza virală.



Structura moleculară a acyclovir



Structura moleculară a guanozinei

Acyclovir difuzează liber în toate celulele, infectate și neinfectate, dar se activează și se acumulează numai în celulele infectate cu herpesvirusuri, deoarece prima treaptă a activării sale, *fosforilarea* în poziția 5' a catenei laterale, este catalizată numai de o *timidin-kinaza* (enzimă care catalizează fosforilarea C5' al pentozei, prima etapă a modificării nucleozidelor pirimidinice pentru încorporarea în ADN) specific virală și în măsură nesemnificativă, de timidin-kinaza celulară.

Afinitatea Tk HSV pentru acyclovir este de circa 3 milioane de ori mai mare decât a Tk celulare. Acyclovir este fosforilat mult mai rapid și de aceea este încorporat preferențial în ADN. Fosforilările ulterioare la formele difosfat și respectiv trifosfat (activ) sunt catalizate de *kinazele* celulare. În cursul replicării ADN, acyclovir-trifosfatul intră în competiție cu dGTP, care este substratul natural al ADN-polimerazei virale. ADN-polimerazele catalizează încorporarea nucleotid-trifosfaților: cele specific virale sunt de circa 30 de ori mai sensibile la acțiunea inhibitorului, decât ADN-polimeazele umane. Datorită faptului că molecula de acyclovir încorporată nu oferă gruparea 3'OH, următoarea nucleotidă nu mai este legată și replicarea ADN este blocată. Odată cu legarea moleculei de acyclovir la ADN, se formează un *complex ternar* la care participă acyclovir, ADN-polimeraza și următorul nucleotid, ceea ce duce la scăderea amplă a sintezei ADN viral. Toate aceste proprietăți fac ca acyclovir să aibă acțiune foarte selectivă asupra multiplicării virale, efectele sale asupra replicării ADN celular fiind nesemnificative (fig. 455). Replicarea ADN al HSV este de 3000 de ori mai sensibilă decât replicarea ADN celular.

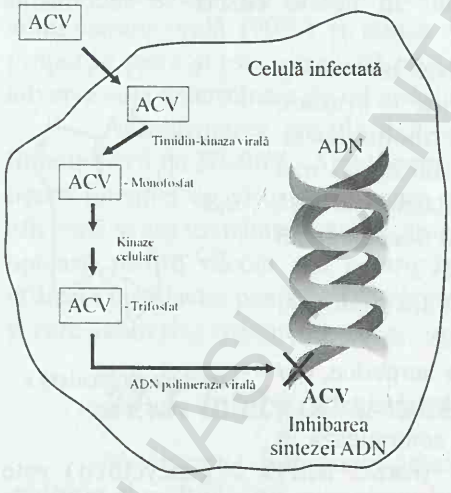
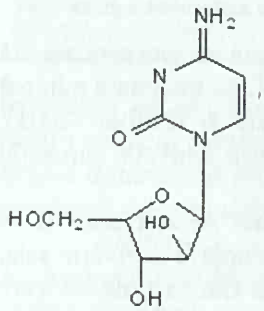


Fig. 455. Ilustrarea schematică a mecanismului de acțiune a acyclovir (ACV). Timidin-kinaza virală catalizează conversia ACV la ACV-monofosfat, iar treapta a II-a a fosforilării este catalizată de kinazele celulare. ADN-polimeraza virală încorporează ACV-trifosfat în ADN și blochează sinteza ADN.

Virusurile care codifică sinteza unor enzime ale căror omologe există și în celulă, au avantajul că se pot multiplica în

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI BIOLOGIE

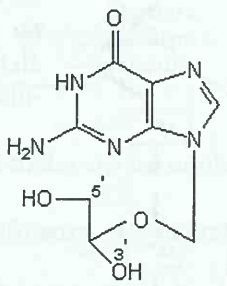
celulele care nu se divid. Herpesvirusurile se deosebesc foarte mult între ele, în privința sensibilității la acyclovir (Bacon şi colab., 2003). HSV este un amestec de tulpini Tk^+ şi Tk^-. Tulpinile Tk^- au capacități limitate de a stabili infecții latente în neuroni, care să se şi activeze. Predomină tulpinile Tk^+, deoarece sunt mai neurovirulente şi au avantajul selectiv de a stabili infecții latente în ganglionii senzitivi, cu capacitatea de reactivare. Astfel, HSV-1 şi HSV-2 sunt extrem de sensibile, necesitând *in vitro* concentrații de 0,04–0,4 μg/ml pentru a obține inhibiția replicării cu 50%. În schimb, Tk VZV nu fosforilează acyclovir la fel de eficient ca enzima omologă de la HSV-1 şi HSV-2. Astfel se explică sensibilitatea de 8–10 ori mai mică a VZV la acyclovir. CMV necesită concentrații foarte mari de acyclovir pentru blocarea multiplicării virale, deoarece acest virus nu codifică o Tk proprie. Nu se ştie dacă virusul Epstein-Barr codifică o Tk capabilă să activeze acyclovir. Acyclovir nu poate acționa în faza de latență a nici unuia dintre virusurile herpetice. Un avantaj major al tratamentului cu acyclovir îl reprezintă absența unor efecte grave de toxicitate. Administrarea intravenoasă produce o creştere tranzitorie a nivelului seric de creatinină, datorată probabil unei obstrucții la nivelul tubilor renali. În literatura de specialitate, a fost descris un sindrom neurologic tranzitoriu, ale cărui manifestări clinice sunt confuzia, letargia, rareori halucinații şi comă. Acest sindrom apare la pacienții imunosupresați, care primesc intravenos doze foarte mari de acyclovir. Acyclovir previne recurența herpetică. După aplicare zilnică, în doze mici, sunt suprimate aproape complet recurențele frecvente. Nu produce efecte secundare, chiar după administrare prelungită. Dacă este administrat profilactic, la pacienții expuşi radiației UV solare sau artificiale, acyclovir oral scade frecvența leziunilor herpetice, care se declanşează în intervalul 2–7 zile, dar nu influențează leziunile care apar în primele 48 de ore de la expunerea la agenții declanşatori. Leziunile care apar în primele 48 de ore sunt consecința reactivării unor tulpini mai virulente, pe fondul unei reactivități imunitare suboptimale. Acyclovir reduce la 14% morbiditatea encefalitei herpetice.



Structura moleculară a citozin-arabinozidei

Rezistența la acyclovir se instalează după administrarea pentru perioade lungi de timp, a dozelor care nu suprimă multiplicarea virală. În condițiile presiunii selective, datorată administrării acyclovir, tulpinile Tk^+ nu se pot multiplica şi o proporție importantă de virioni suferă conversie de la Tk^+ la Tk^- sau la forme care au capacitate redusă de a codifica Tk. Astfel de mutante sunt rezistente, deoarece nu fosforilează acyclovir. După oprirea tratamentului, tulpinile Tk^- reversează la Tk^+. Un alt mecanism de rezistență este expresia unei ADN-polimeraze cu afinitate redusă pentru acyclovir-trifosfat şi respectiv, expresia unei Tk cu proprietăți alterate de legare a medicamentului. În aceste cazuri se recomandă administrarea *foscarnet*, cu un mecanism de acțiune diferit.

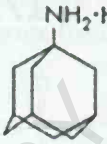
Gancyclovir (1,3-dihidroxi-2-propoximetil guanina), este un analog nucleozidic asemănător acyclovir, cu deosebirea că mai conține o *grupare hidroximetil* ce se comportă asemănător cu gruparea 3'hidroxil a ribofuranozei. Este activ față de toate virusurile herpetice umane şi este de 100 de ori mai eficient în comparație cu acyclovir, față de CMV uman. Toxicitatea este însă mult mai mare decât a acyclovir şi din această cauză este folosit doar în cazul pacienților imunocompromişi cu infecții severe provocate de CMV.



Structura moleculară a gancyclovir

Nu se cunoaşte mecanismul care face ca *gancyclovir* să fie mult mai eficient decât acyclovir în tratamentul infecțiilor produse de CMV. Gancyclovir este activat specific în celulele infectate cu virusuri herpetice, dar în special de Tk codificată de gena UL97 a CMV. În celulele infectate cu CMV, gancyclovir este activat de *timidin-kinaza celulară* şi se acumulează în concentrație mai mare decât acyclovir. Gancyclovir-trifosfat (forma activă a gancyclovir) este încorporat în catenele ADN virale, ceea ce duce la scăderea ratei replicării genomului viral. Datorită prezenței grupării 3'OH, gancyclovir nu funcționează ca un terminator al sintezei catenei DNA. Acest compus are efecte mitogene asupra celulelor mamaliene, este carcinogen şi embriotoxic. La om produce efecte toxice asupra măduvei osoase, la circa 25% dintre cazurile tratate. Studii recente au arătat că la 8% dintre pacienții tratați cu gancyclovir pentru o perioadă mai mare de 3 luni, tratamentul a eşuat, ceea ce sugerează posibilitatea selectării unor tulpini virale rezistente la acest compus.

27.2. Amine ciclice



Structura moleculară a amantadinei

Adamantanii (amantadina şi derivatul ei *α-metil-amantadina* sau *rimantadina)* sunt utilizaţi pentru tratamentul infecţiilor cu virusul influenza. Din punct de vedere chimic, sunt *amine ciclice* care derivă formal de la hidrocarbura policiclică *adamantan.*

Amantadina este o amină triciclică, derivatul 1-amino al adamantanului, un compus complex cu 10 atomi de C, cu o structură de colivie.

Rimantadina este un derivat aproape identic, metilat, al amantadinei. Ambele inhibă multiplicarea virusului influenza A *in vitro* şi *in vivo*, dar nu inhibă virusul influenza B.

Structura moleculară a rimantadinei

Mecanismul de acţiune şi spectrul activităţii antivirale sunt identice, însă rimantadina este metabolizată diferit de amantadină şi produce efecte secundare (febră, insomnie, dificultăţi de concentrare). Amantadina blochează faza timpurie a infecţiei – *dezvelirea* – dar influenţează şi fazele tardive ale multiplicării: asamblarea virionilor şi înmugurirea (Brady şi colab., 1990). Sensibilitatea virusurilor gripale la amantadină este determinată de prezenţa proteinei M_2 la nivelul membranei plasmatice a celulelor infectate şi în cantitate foarte mică în structura virionilor. S-a presupus că, această proteină ar forma *canale ionice* care ar permite trecerea protonilor din endosom spre interiorul virionului, ducând la scăderea pH, ceea ce determină eliberarea nucleoproteinei virale în citoplasma celulei infectate. În cursul procesului de asamblare virală, protonii sunt transferaţi invers, la exteriorul veziculei de exocitoză, proteina M_2 menţinând nivelul pH peste valoarea la care intregritatea hemaglutininei virale ar fi afectată şi nu ar mai putea fi încorporată în peplosul viral. Se pare că amantadina blochează mecanismul de transfer al protonilor mediat de proteina M_2, inhibând dezvelirea virionilor, maturarea virionilor sau ambele procese. În absenţa acidifierii regiunii centrale a virionului în endosom, proteina M_1 nu se disociază de complexul ribonucleoproteic şi acesta nu este transferat spre nucleu. Amantadina este mai eficace dacă în organism se găsesc anticorpii specifici preformaţi. *In vitro*, la concentraţii mult mai mari, adamantanii blochează multiplicarea şi a altor virusuri ARN: influenza B şi paramixovirusuri. Din această cauză, adamantanii se folosesc doar pentru tratamentul infecţiilor cu influenza A. Variantele virale rezistente apar rapid, în 5–7 zile de terapie: 16–45% dintre izolate virale pot fi rezistente.

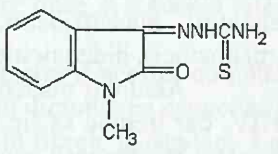
Ambele medicamente se găsesc în formulări pentru administrare orală. Amantadina atinge nivelul maxim în plasmă la 2–4 ore după administrarea orală şi peste 90% reapare nemodificată în urină. Se excretă prin secreţie tubulară şi filtrare glomerulară. Rimantadina se absoarbe bine după administrare orală (90%) şi atinge valori plasmatice inferioare amantadinei. Este metabolizată în proporţie mare şi este eliminată prin mecanisme renale. Circa 10% se elimină nemodificată. Efectele adverse sunt determinate de tulburări ale activităţii SNC: nervozitate, vertigo, insomnie.

Administrarea profilactică a celor doi compuşi, în cazul unei epidemii, reduce riscul îmbolnăvirii cu 50–90%. Ambii compuşi sunt mai eficienţi în prevenirea apariţiei simptomelor clinice tipice infecţiei cu virusul influenza A, decât în prevenirea apariţiei infecţiei propriu-zise. Deşi este eficientă şi are toxicitate scăzută, amantadina a fost un eşec comercial, deoarece majoritatea indivizilor optează pentru vaccin sau pentru îmbolnăvire, decât să facă profilaxie zilnică. Rimantadina este utilizată profilactic pentru a proteja persoanele care nu au fost vaccinate sau nu pot beneficia de vaccin şi care au un risc crescut de a face complicaţii consecutive infecţiei cu virusul gripal A.

27.3. Inhibitori ai sintezei proteinelor virale: β-thiosemicarbazone

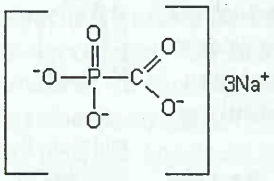
Methisazone (β-thiosemicarbazone) este un compus sintetic antiviral, inhibitor al multiplicării poxvirusurilor.

Pentru ca efectele inhibitorii să fie demonstrabile, compusul trebuie să fie administrat la iniţierea procesului infecţios. Mecanismul de acţiune este ipotetic: pare să inhibe traducerea ARNm viral tardiv. Consecinţa este o reducere netă a sintezei proteinelor virale tardive, prin dezorganizarea polisomilor. Odată cu eradicarea variolei, medicamentul a ieşit din uz.



Structura moleculară a methisazonei

27.4. Foscarnet



Structura moleculară a foscarnet

Foscarnet (fosfono-formiat trisodic) este un analog al pirofosfatului, care nu se aseamănă cu nici un alt medicament antiviral utilizat în clinică. A fost sintetizat la sfârşitul anilor '70 ca o alternativă (mai puţin toxic şi mai eficient) la acidul fosfonoacetic. Medicamentul este foarte util pentru tratarea infecţiilor cu virusuri herpetice rezistente la acyclovir.

Spre deosebire de compuşii antivirali analogi ai bazelor azotate, *foscarnet* nu necesită o activare prealabilă sub acţiunea kinazelor virale sau celulare. Foscarnet funcţionează ca un *inhibitor necompetitiv al ARN- şi ADN-polimerazelor*, legându-se la situsul de legare al pirofosfatului şi inhibă necompetitiv legarea de substratul nucleotidic (Piret şi colab., 2001). Deşi mecanismul inhibiţiei sintezei ARN şi ADN nu este cunoscut cu exactitate, una dintre ipoteze sugerează că forcarnet legat la polimerază, formează un intermediar instabil cu nucleozid-monofosfaţii, conducând la degradarea acizilor nucleici. Foscarnet inhibă *polimerazele celulare* cât şi pe cele *virale*, dar enzimele virale sunt mult mai sensibile decât cele celulare (cele virale sunt inhibate de concentraţii de 1/2 – 1/10 din cele necesare pentru inhibarea enzimelor celulare): inhibă polimerazele unor tulpini ale serotipului A de virus gripal, ale virusurilor herpetice umane, virusului hepatitei B şi reverstranscriptaza HIV. Foscarnet s-a dovedit a fi extrem de eficient în tratarea pacienţilor SIDA, infectaţi cu tulpini de HSV sau VZV rezistente la aciclovir.

Foscarnet are unele dezavantaje majore. Se administrează intravenos şi dozele trebuie să se repete la intervale scurte, pentru că timpul de înjumătăţire este foarte scurt (Noormohamed şi colab., 1998). De aceea, se încearcă mărirea timpului de înjumătăţire prin conjugare cu alcooli cu catena lungă (derivaţi de la acizi graşi). Un alt dezavantaj, o consecinţă a structurii sale chimice, este că la pH fiziologic acest compus este ionizat şi traversează foarte greu membrana plasmatică celulară. În LCR, concentraţia de foscarnet este de aproximativ 40% faţă de cea plasmatică. Aproximativ 30% din cantitatea de foscarnet se depozitează în oase, ceea ce determină o creştere a timpului de înjumătăţire la câteva luni (Sjovall şi colab., 1989). Medicamentul produce efecte adverse: perturbarea funcţiei renale, induce dezechilibre electrolitice (Ca^{2+}, PO_4^{2-}, K^+, Mg^{2+}). Are acţiune chelatoare intensă pentru ionii bivalenţi, în special Ca^{2+}, producând scădere severă, în funcţie de doză, ce poate fi fatală.

27.5. Chimioterapia infecţiei cu HIV

Interesul pentru terapia infecţiei cu HIV este justificat de numărul în continuă creştere al persoanelor infectate. Astfel, la sfârşitul anului 1999, 34,3 milioane persoane erau infectate sau manifestau semnele clinice ale SIDA. În fiecare zi, se infectează circa 15000 de persoane. 95% din totalul persoanelor infectate se găsesc în ţările în curs de dezvoltare. Până în 1999, 18,8 milioane adulţi şi copii au murit de SIDA, de la recunoaşterea epidemiei ca entitate clinică. Găsirea unor modalităţi eficiente de stopare a multiplicării virale este foarte importantă pentru clinică, deoarece SIDA se corelează cu un titru viral crescut. Medicaţia anti-HIV încearcă să blocheze multiplicarea virusului în oricare treaptă a ciclului său (Schwartz şi Nair, 1999). În interiorul celulei, blocarea ciclului de multiplicare este posibilă prin inhibiţia reverstranscriptazei sau a proteazei HIV.

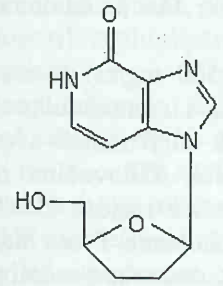
Medicamentele cu o relativă eficienţă anti-SIDA intră în 3 categorii majore:

– analogi ai nucleozidelor, ce acţionează ca inhibitori ai reverstranscriptazei;
– inhibitori nenucleozidici ai reverstranscriptazei;
– inhibitorii activităţii proteazei.

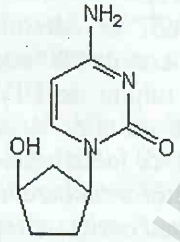
Reverstranscriptaza este enzima virală care converteşte informaţia genetică virală ARN, într-o moleculă complementară de ADN dublu catenară. Inhibiţia reverstranscriptazei este produsă de analogii nucleozidelor: zidovudina (azidotimidina – AZT), dideoxiinozina (DDI) (analogă guanozinei), dideoxicitidina (DD).

Analogii nucleozidelor se aseamănă cu substanţele naturale care intră în compoziţia ADN al HIV, dar trebuie să fie fosforilaţi de enzimele celulare, deoarece virusul nu codifică Tk. Dincolo de punctul încorporării analogilor bazelor, reacţia de polimerizare şi de sinteză a ADN HIV este blocată. Selectivitatea acţiunii lor s-a datorat inhibiţiei reverstranscrierii. Compuşii din prima generaţie au

produs toxicitate pe termen lung: mitocondrială (didanozina), nefrotoxicitate (cidofovir). Ulterior s-au selectat analogi ai nucleozidelor şi nucleotidelor mai puţin toxici. Primul compus al grupului este zidovudina (Gotzsche, 1993).

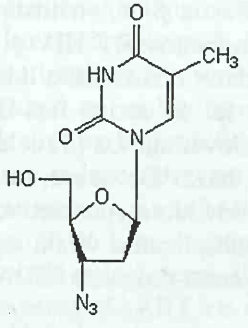


Structura moleculară a dideoxiinozinei



Structura moleculară a dideoxicitidinei

Zidovudina (3'-azido-3'-deoxitimidina), analog al deoxitimidinei, denumită anterior *azidotimidina* (AZT), este un compus de sinteză din familia analogilor nucleozidici dideoxi, la care grupările OH 2' şi 3' ale inelului β-D-ribofuranozic au fost înlocuite cu atomi de hidrogen şi respectiv cu gruparea azidă (N_3).



Structura moleculară a zidovudinei

Iniţial (Horwitz, 1964), compusul a fost utilizat pentru proprietăţile sale antineoplazice, iar ulterior s-au descoperit cele antivirale (inhibitor al virusului leucemiei felinelor). În 1985 s-a descoperit capacitatea sa de a inhiba HIV. Compusul a devenit disponibil pentru clinică în 1987, iar în prezent se foloseşte în schema tratamentului infecţiei cu HIV (De Cock şi colab., 1993; Zhou şi colab., 1999). Compusul este fosforilat de către *timidin-kinaza celulară*, în celulele infectate şi neinfectate, la derivaţii mono-, di- şi trifosfat care reprezintă formele active. Forma fosforilată directă este inactivă, deoarece nu traversează membrana. Zidovudin-trifosfatul, forma activă a AZT, este un *inhibitor competitiv al reverstranscriptazei HIV*. Zidovudin-trifosfatul are o afinitate de 100 de ori mai mare pentru reverstranscriptază (Km mic) decât pentru substratul natural deoxitimidin-trifosfatul (dTTP) (Km mare). Zidovudin-trifosfatul este încorporat în lanţul ADN în curs de sinteză, ca *AZT-monofosfat* şi datorită faptului că în poziţia 3' se află gruparea azido- şi nu o grupare hidroxil, următorul nucleotid nu se poate lega şi sinteza ADN este stopată. Reverstranscriptaza nu excizează AZT încorporată. Zidovudina este activă faţă de retravirusuri mamaliene şi aviare şi faţă de virusul Epstein-Barr. AZT se găseşte în formulări pentru administrare orală şi parenterală. La concentraţia de 1–5 μm, AZT inhibă activitatea RT, dar nu inhibă replicarea ADN celular. După administrare orală, AZT se absoarbe repede şi total, cu valori maxime în sânge la 30–90 min. Pătrunde în LCR şi, de aceea, AZT este folosită pentru tratamentul manifestărilor neurologice ale SIDA. Este catabolizată în ficat, în principal prin conjugare cu *acidul glucuronic*. Din acest motiv, metabolizarea zidovudinei este blocată de alţi compuşi care sunt catabolizaţi pe aceeaşi cale la nivel hepatic (agenţi anti-inflamatori nesteroidici, analgezice narcotice). Un dezavantaj al acestui compus este timpul de înjumătăţire foarte scurt la nivel plasmatic, fapt pentru care necesită administrare frecventă, dar în celulă stabilitatea sa este net superioară. AZT traversează bariera placentară.

Deşi celulele mamaliene nu posedă reverstranscriptaza, totuşi AZT are toxicitate moderată. Zidovudin-monofosfatul inhibă competitiv timidilat-kinaza, enzima care catalizează conversia nucleozid-monofosfatului, la nucleozid-difosfat (Chun şi colab., 2001). De aceea, în celulele infectate şi în cele normale, nivelul intracelular de nucleozid di- şi trifosfaţi scade, ceea ce duce la scăderea ratei sintezei ADN.

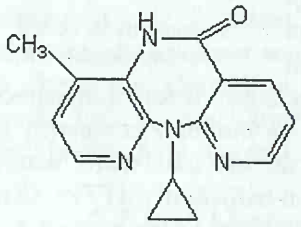
AZT este toxică pentru măduva osoasă. Efectele secundare ale administrării acestui compus sunt: anemie severă, neutropenie, dureri de cap, miopatie manifestată clinic prin diminuarea capacităţii contractile a musculaturii, iar anatomic, prin apariţia mitocondriilor anormale în fibrele musculare. La pacienţii supuşi tratamentelor cu zidovudină, creşte riscul de a dezvolta limfoame non-Hodgkin, probabil ca o consecinţă a imunosupresiei îndelungate (Hoggard şi colab., 2001). La pacienţii cu

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

SIDA, supuşi unui tratament de lungă durată cu zidovudină, s-a constatat instalarea unei rezistenţe a virusului HIV faţă de acest compus. AZT se foloseşte pentru tratamentul tuturor stadiilor infecţiei cu HIV. Dozele mari de 1200–1500 mg/zi prelungesc supravieţuirea, reduc frecvenţa infecţiilor oportuniste, bolnavul câştigă în greutate, viremia diminuează, iar funcţia imunitară se ameliorează (Kakuda şi colab., 2001).

În prezent, AZT se administrează în doze mici (300–500 mg/zi) şi are efecte secundare limitate. Doza optimă este de 600 mg/zi (Cato şi colab., 1998). După tratamentul prelungit mai mult de 6 luni, se selectează tulpini de HIV rezistente la AZT, datorită unei mutaţii a genei care codifică reverstranscriptaza şi de aici decurge ineficienţa tratamentului. Zidovudina nu elimină şi nu neutralizează virusul, ci încetineşte evoluţia SIDA. Efectele toxice majore ale AZT se produc la nivelul măduvei hematoformatoare, cu monocitopenie şi granulocitopenie. Poate induce anemie severă şi necesită transfuzie sau oprirea terapiei. Dozele mari produc o stare de rău general şi dureri de cap.

Didanozina (2'–3' dideoxiinozina – ddI) este un dideoxinucleozid, analog al deoxiadenozinei. Enzimele celulare o convertesc la ddI-monofosfat, apoi la dideoxiadenozin (ddA)-monofosfat, ddA-difosfat şi ddA-trifosfat (ddATP), forma activă. Ca şi trifosfaţii altor dideoxinucleozide, ddATP inhibă competitiv RT HIV şi acţionează ca terminator al catenei de ADN. ADN-polimeraza α umană este relativ rezistentă la ddATP, dar variantele β şi γ sunt mai sensibile. *In vitro*, ddATP intracelulară este la fel de activă faţă de RT HIV, ca şi zidovudina. Este activă faţă de tulpinile HIV rezistente la zidovudină. La pH acid gastric, ddI este inactivată datorită hidrolizei legăturii glicozidice dintre glucid şi bază. De aceea, se administrează în asociaţie cu un tampon al aciditătii gastrice. Acyclovir şi zidovudina sunt active numai faţă de virusurile care se multiplică, iar după oprirea tratamentului, multiplicarea virală este reluată. Acyclovir nu împiedică recurenţele ulterioare, iar zidovudina nu opreşte progresia SIDA, ceea ce denotă că aceşti agenţi nu elimină virusurile în stare latentă.



Structura moleculară a neviparinei

O altă clasă de medicamente sunt *inhibitorii nenucleozidici* ai reverstranscriptazei. Compuşii din această categorie (neviparina) sunt inhibitori direcţi ai RT HIV, deoarece interacţionează cu proteina şi alterează conformaţia situsului catalitic. O singură mutaţie, chiar punctiformă a genei RT, este adeseori suficientă pentru a diminua eficienţa acestor compuşi.

În tratamentul infecţiilor virale, se foloseşte de asemenea o altă clasă de agenţi chimici care sunt *inhibitorii proteazei*. Proteaza HIV este o aspartic-protează, codificată de virus şi are rolul de a genera peptide structurale dintr-un precursor viral. Inhibitorii proteazei sunt reprezentaţi de *molecule peptidice mici*, care mimează substratul natural al reacţiei (Ikuta şi colab., 2000). Ele acţionează prin blocarea situsului catalitic al proteazei HIV, împiedicând generarea proteinelor virale prin clivarea precursorilor şi astfel este stopat procesul maturării virale. O singură mutaţie a genei ce codifică sinteza proteazei HIV este suficientă pentru a face ca medicamentele să devină ineficiente.

N-butyldeoxynojirimycin (N-butyl-DNJ) elimină complet HIV din celulele infectate cronic (Fischer şi colab., 1995). Compusul acţionează prin inhibiţia glicozilării gp120 a învelişului viral, reducând capacitatea ei de a se lega de receptorii CD_4. Glicozilarea glicoproteinelor virale este nespecifică şi este catalizată de enzimele celulare, dar activitatea N-butyl-DNJ, *in vitro*, este foarte specifică faţă de celulele infectate cu HIV.

O altă ţintă a terapiei infecţiei cu HIV este ARNm. Principiul constă în construcţia oligonucleotidelor mici, complementare genelor virale sau secvenţelor ARNm (oligonucleotide antisens). Acestea se leagă de acidul nucleic şi blochează sinteza proteinelor. Deoarece gena *rev* are rol reglator esenţial, s-a obţinut ARN-anti ARNm al acestei gene. Efectul a fost inhibiţia sintezei proteinelor în celulele infectate cronic, *in vitro*.

Interferenţa cu prima treaptă a ciclului infecţios – legarea HIV de receptorul CD_4 al membranei limfocitare – a fost propusă ca o modalitate de tratament. CD_4 solubil recombinat este o moleculă incompletă, din care lipsesc secvenţele transmembranară şi citosolică, care se leagă cu gp120 şi împiedică legarea virusului de limfocitele T_{CD4}. Preparatul nu este toxic, dar timpul de înjumătăţire este foarte scurt.

Strategia curentă pentru terapia infecţiei HIV este denumită HAART (*Highly Active Anti-Retraviral Therapy*) şi utilizează combinaţii ale diferitelor medicamente: un *inhibitor al proteazei*,

asociat cu *doi analogi nucleozidici inhibitori* ai reverstranscriptazei (Blazevic şi colab., 2001). La pacienţii supuşi terapiei HAART, infecţia unor noi celule nu este complet blocată. HIV persistă, cu o rată foarte scăzută a multiplicării în *rezervorul celular* reprezentat de macrofage, celule T CD_4 neangajate şi chiar celulele T CD_4 de memorie, ceea ce permite eliberarea virionilor progeni şi infecţia unor noi celule. Dovezile multiplicării HIV la pacienţii trataţi HAART sunt următoarele:

- mulţi pacienţi au nivele plasmatice scăzute ale ARN viral, sub limita de detectare prin testele convenţionale (200–500 copii/ml), dar detectabile prin metode sensibile care determină cantităţi de 10–50 de copii ARN/ml;
- pacienţii trataţi cu HAART devin aviremici, dar prin metoda hibridizării *in situ* sau RT-PCR se detectează celule infectate productiv, care exprimă ARN HIV-1 (Servais şi colab., 2001);
- diferenţele cantitative dintre ADN-HIV total şi integrat în celulele TCD_4 sugerează existenţa celulelor infectate recent cu HIV-1, în care ADN este neintegrat. Acestea sunt copii lineare complete revers-transcrise, care suferă o reacţie aberantă de legare cap la cap, în loc să se integreze în cromosomul gazdei.

Pentru eliminarea rezervorului de virus se impune creşterea dozei terapeutice combinate care să inhibe complet multiplicarea virusului. Dar, rezervorul de virus are o persistenţă îndelungată, iar terapia HAART este toxică. Pentru eliminarea rezervoarelor de virus se propune stimularea transcrierii şi multiplicării virale în celulele infectate latent, sub acţiunea *citokinelor*. Odată cu multiplicarea virusului, celulele mor datorită efectului citopatic sau expun antigene virale şi devin ţinta acţiunii litice a limfocitelor TCD_4 citolitice. Astfel, o combinaţie de IL-2, IL-6 şi TNFα poate induce activarea şi multiplicarea virusului în celulele infectate latent, *in vitro*. IL-2 produce creşterea numerică a celulelor T CD_4, dar nivelul viremiei a rămas nemodificat. Celulele infectate latent cu HIV-1 nu exprimă receptori de înaltă afinitate pentru IL-2, citokina poate activa multiplicarea virală prin intermediul receptorilor de mică afinitate sau indirect prin alte citokine ale cascadei. Asocierea HAART cu un agent care să activeze specific numai celulele TCD_4 infectate latent, ar fi soluţia terapeutică ideală. Terapia multiplă reduce riscul emergenţei unei tulpini virale cu rezistenţă multiplă.

Terapia anti-HIV este ineficientă datorită unor particularităţi moleculare şi biologice ale HIV:

- genomul viral se integrează într-un cromosom celular şi infecţia rămâne latentă o perioadă nedefinită;
- virusul se poate disemina prin transfer intercelular direct, fără o fază extracelulară;
- virusul infectează celule circulante (limfocite, macrofage) şi se diseminează sistemic;
- virusul poate infecta celule ale SNC şi agenţii terapeutici ar trebui să depăşească bariera hemato-encefalică;
- virusul scapă acţiunii Ac specifici şi rămâne infecţios;
- apariţia frecventă a variantelor antigenice.

Imunoglobulinele antivirale sunt disponibile în 3 variante:

- preparatul de globuline imune (IG) pentru injectare intramusculară;
- preparatul de imunoglobuline pentru injectare intravenoasă (IVIG) ;
- preparate de imunoglobuline injectabile intravenos, cu titru înalt de anticorpi.

Toate variantele se obţin din plasma umană şi conţin predominant IgG, dar şi alte izotipuri. Se pot obţine preparate cu un titru înalt de imunoglobuline faţă de anumite antigene virale, prin imunizarea animalelor. Preparatul IG nu poate fi administrat intravenos, datorită tendinţei IgG de a forma agregate, care, *in vivo*, fixează complementul. Imunoglobulinele sunt mai eficiente dacă sunt administrate profilactic, decât terapeutic. Preparatele IG se folosesc în primul rând pentru prevenirea hepatitei A şi se administrează pacienţilor, în câteva zile după consumul alimentelor contaminate. Preparatele IG hiperimune obţinute prin imunizarea animalelor se administrează postexpunere la VHB şi la virusul rabic. Preparatul IG specific antirabic se obţine din plasma donorilor hiperimunizaţi.

27.6. Imunoterapia

Variabilitatea genetică a HIV a împiedicat dezvoltarea unui protocol al imunizării SIDA. S-au obţinut anticorpii anti-proteină de înveliş gp120, pentru blocarea interacţiunii gp120 şi implicit a infecţiei (Takeda şi colab., 1992). Dar, abordarea n-a avut succes, deoarece gena ce codifică gp120

suferă mutații și rezultă variante antigenice ale proteinei care nu sunt recunoscute de Ac (Cease și colab., 1987). S-au obținut vaccinuri subunitare, prin inserția câtorva gene ce codifică proteine ale învelișului HIV, în genomul virusului vaccinal sau adeno-, ca vectori de expresie clonați în sisteme celulare. S-a încercat vaccinarea cu *virus inactivat*. Preparatul viral inactivat are utilizare limitată numai la indivizii infectați cu HIV, deoarece metodele de inactivare nu au un grad de certitudine de 100% și pot fi însoțite de păstrarea unei infecțiozități reziduale. Există încercări de a obține *virus atenuat infecțios* pentru a-l folosi ca agent imunizant, deoarece indivizii infectați cu HIV-2 cauzează o formă mai ușoară de SIDA, cu o perioadă de latență mai lungă și protejează față de infecția cu HIV-1.

27.7. Rezistența virală la agenții chimioterapeutici

Având o structură genetică relativ simplă și fiind metabolic inerte, virusurile au puține mecanisme de a dobândi rezistența la agenții chimioterapeutici.

Virusurile au două proprietăți care le permit să scape de acțiunea inhibitorilor:

– multiplicarea la un titru înalt în celula gazdă sensibilă;

– apariția mutațiilor cu o rată înaltă.

Mutația este forța motrice a evoluției sistemelor vii. Virusurile nu întrunesc criteriile minimale ale celui mai simplu sistem viu, dar evenimentele mutaționale au o frecvență mare.

Cele mai multe virusuri cu *genom ADN*, au rate de mutație inferioare ribovirusurilor. Mutabilitatea lor este puțin cunoscută, dar este dedusă indirect din diferite observații: de exemplu, virusurile herpetice pot deveni rezistente la medicația antivirală, fapt ce creează dificultăți clinice.

In general, *genomul ribovirusurilor* are dimensiuni reduse, iar rata de mutație/nucleotid/tur de multiplicare este maximă, fapt care permite o rată de evoluție de milioane de ori mai rapidă decât a gazdelor lor. Supuse permanent presiunii selective a factorilor de apărare a gazdei, evoluția virusurilor este exclusiv *adaptativă*. Ratele foarte înalte de mutație, generează așa numitele "mutante de roire" sau populații de *quasispecii* de virusuri, care conferă o mare adaptabilitate multiplicării virale, menită să compenseze șansa minimă a interacțiunii cu substratul permisiv.

Dar, rata mutației nu trebuie să depășească un "prag al erorilor", care ar genera un virus incapabil de multiplicare. Quasispeciile de virusuri ARN, se adaptează la un prag de erori mutaționale, compatibil cu multiplicarea. Se consideră că virusurile se multiplică la limita superioară a mutabilității și adaptabilității. Datorită ratei înalte a mutației, clonele de ribovirusuri și retravirusuri sunt quasispecii sau "mutante roitoare", care prezintă variații genetice genomice. Populațiile de quasispecii conferă virusurilor cu genom ARN o adaptabilitate perfectă la mediul gazdei și o capacitate de evoluție foarte rapidă. Anumite secvențe ale genomului sunt mai stabile decât altele, dar și cele mai stabile suferă mutații cu o rată superioară în raport cu dezoxiribovirusurile.

Mutabilitatea accentuată se datorează naturii intrinseci a funcției ARN-polimerazei virale, predispusă la erori ("*error prone*"), ca o consecință a absenței funcției de corectare (*proof reading*), în timp ce majoritatea ADN-polimerazelor virale își corectează erorile proprii. Diferitele familii de ribovirusuri au rate diferite de mutație. Dintre enzimele de transcriere și replicare a genomului ARN, RT are o predispoziție mai accentuată la erori, ceea ce se corelează cu o rată înaltă a mutației în ciclul de multiplicare a retravirusurilor. Genomul integrat ca ADN proviral este copiat de aparatul enzimatic al celulei, cu o fidelitate relativă și de aceea, retravirusurile endogene evoluează foarte lent, comparativ cu cele exogene (infecțioase).

Modificarea ARN posttranscriere este o cauză majoră a apariției mutațiilor. Modificarea extensivă s-a descris inițial pentru ARNm al proteinei M (matrix) a virusului rujeolic de la pacienții cu PESS.

În contrast cu modificarea frecventă adenozină – inozină (A-I) la unele virusuri ARN, există câteva cazuri de ARN viral și celular la care conversia A – I, catalizată de ADAR, are loc cu selectivitate înaltă, la poziții specifice ale A. De exemplu, la HDV, ARN editing are rol esențial pentru sinteza a două proteine cu funcții diferite, de la un ORF: sinteza AgD se face după conversia selectivă a codonului terminal amber UAG, la codonul Trp UIG. Antigenul D este o proteină bazică fosforilată și se acumulează în nucleii celulelor infectate. Este componenta internă a HDV. Mecanismul generării celor două variante este următorul: în timpul replicării genomului, o fracție a copiilor de ARN antigenomic, suferă unul sau mai multe evenimente de "editing" post-transcriere. Unul dintre ele este

esențial: *A* din mijlocul codonului terminal *amber* UAG al ARN codificator al *Ag D de 195 aminoacizi*, este dezaminată de o enzimă a celulei. Dezaminarea *A* are importanță biologică majoră. Conversia *A* la *I* (*Inozină*) modifică mesajul ARN, deoarece *I* este recunoscută ca *G* (nu ca A). Molecula de ARN astfel modificată este tradusă într-o proteină a cărei secvență de aminoacizi diferă față de a proteinei native. Codonul terminal *amber* este înlocuit cu codonul (UIG) pentru sinteza Trp. ARNm modificat, codifică o proteină mai mare – *antigenul D de 214 aminoacizi*, o proteină bazică, fosforilată care se acumulează în nucleul celulei infectate.

Pentru virusurile cu genom ARN de polaritate negativă, *hipermutația datorată dezaminării A* este asociată cu *persistența* infecției. Pentru virusurile cu genom ADN dc, modificarea reprezintă un mecanism prin care copiile de ARNm timpuriu sunt inactivate.

Marea diversitate a ribovirusurilor se explică prin mutabilitatea accentuată și *adaptabilitatea* lor. Cu puține excepții, virusurile capabile să infecteze insecte și animale superioare sau insecte și plante au genom ARN. Adaptabilitatea quasispeciilor le permite deplasarea între diverse medii selective. Adeseori, numai una sau câteva schimbări mutaționale permit unui virus să dobândească virulență, să-și schimbe tropismul și să devină rezistent la un medicament antiviral sau la anticorpii specifici. Variațiile secvenței de baze a quasispeciilor pot influența *severitatea infecției virale*. Faptul este extrem de important pentru cercetători și pentru clinicieni, care tind să considere virusul rujeolic, HIV, virusul hepatitei C sau polio, ca entități infecțioase unice, la care diferiții pacienți răspund diferit. Se ignoră natura fundamentală a ribovirusurilor, adică mutabilitatea lor accentuată, materializată în existența quasispeciilor. Heterogenitatea quasispeciilor, caracterul tranzitoriu, întâmplător, nedeterminat și imprevizibil al apariției lor, creează o genetică aleatorie, contraintuitivă. Baza ubicvității ribovirusurilor este chiar heterogenitatea lor genetică. Existența quasispeciilor ridică probleme insurmontabile controlului majorității infecțiilor cu ribovirusuri, prin intermediul vaccinurilor. Vaccinarea a avut succes pentru unele viroze (produse de virusul polio, rujeola, oreionul, variola), deoarece anumiți epitopi antigenici ai proteinelor virale, au o probabilitate mică de a se modifica fără să compromită infecțiozitatea lui. Dar, pentru alte ribovirusuri (FMDV, HIV_1, virusul hepatitei C) natura efemeră a quasispecilor pune probleme dificile în calea identificării epitopilor stabili (sau puțin variabili) și imunizanți (stimulatori ai răpunsului imun protector). Cele mai multe virusuri ARN, suferă o divergență evolutivă, prin substituția bazelor cu o rata de $1/10^2$–10^4/nucleotide/an. Rata evoluției virusurilor nu este constantă. Apariția unor noi ribovirusuri în viitor, este o certitudine. Unele apariții se vor datora contactului omului cu virusuri "vechi" de la animalele junglei neexplorate, iar altele vor apărea prin *recombinare, reasortare* sau prin *mutație*. Apariția este însă condiționată de evoluția rapidă a quasispeciilor și de capacitatea lor de adaptare rapidă la gazda umană. Adaptarea rapidă va determina transmiterea epidemică sau pandemică la om, așa cum se întâmplă cu influenza A, HIV_1, sau va implica omul ca o gazdă sporadică (virusul febrei hemoragice etc.). Este foarte probabil ca majoritatea ribovirusurilor umane, să fi evoluat în ultimele mii sau zeci de mii de ani, dar unele sunt mult mai recente. După Brown (1989), virusurile "noi" au evoluat din interacțiunile genelor cromosomale, cu elemente genetice mobile și cu virusurile "vechi" și din acest punct de vedere, evoluția virusurilor este un proces care nu se termină niciodată. După Botstein (1981), produsul evoluției virale nu este un virus anume, ci o familie de elemente genetice denumite *module*, fiecare dintre ele purtând o funcție biologică particulară. Fiecare virus este rezultatul unei combinații favorabile de module. Recombinarea genetică furnizează noi variante de module, din care se perpetuează cele mai adaptate.

De cele mai multe ori, *rezistența este rezultatul mutației genetice*, care produce modificări ale enzimelor sau ale componentelor structurale ale virionului. Eficiența acestui mecanism se observă în culturile celulare, unde virusurile dezvoltă rezistență după numai câteva pasaje, în prezența agentului inhibitor. Rezistența herpesvirusurilor, la pacienții imunocompetenți apare rareori, însă tulpinile rezistente de virus influenza apar cu frecvență mare. În general, virusurile rezistente la acțiunea agenților chimioterapeutici, par să aibă o virulență redusă și produc infecții mai ușoare, în special herpesvirusurile. Tulpinile rezistente de influenza A sunt la fel de virulente ca și tulpinile naturale. Detectarea și evaluarea genelor de rezistență se face prin diferite metode. Cele tradiționale implică inocularea culturilor celulare cu virusuri, expunerea la agenți inhibitori și determinarea modificărilor ulterioare în celulă sau a cantității de virus progen. Metoda nu este totdeauna relevantă pentru populațiile de virusuri *in vivo*. Virusurile

izolate de la pacienți sunt populații heterogene, cu sensibilitate diferită la agenții inhibitori și chiar cu proprietăți diferite de multiplicare în diferite substraturi celulare. Metodele noi pentru detectarea genelor de rezistență sunt cele moleculare, inclusiv PCR.

Evoluția procesului infecțios are caracteristici strict individuale, datorate particularităților genetice ale gazdei și ale agentului infecțios. De aceea, scopul geneticii medicale este *medicina personalizată*. Intr-un scenariu (puțin probabil) al viitorului fiecare individ ar trebui genotipizat pentru un număr cât mai mare de locusuri, cu scopul de a identifica sensibilitatea genetică individuală la diferite maladii infecțioase sau neinfecțioase.

Optimiștii speră că medicina poate fi schimbată de la artă la știință, prin dezvoltarea farmacogeneticii. Farmacogenetica este influențată de absorbția medicamentului, de distribuția sa la situsul acțiunii, de interacțiunea cu țintele sale (enzime sau receptori), de metabolizare și de excreție.

Metabolizarea medicamentului este o etapă esențială a farmacogeneticii și este dependentă de citocromii P_{450}. Genele codificatoare CYP formează o familie cu peste 57 de alele funcționale și peste 33 de pseudogene. Produsele genelor catabolizează o varietate largă de substraturi. Modificările constau în oxidări, peroxidări, reduceri. La om, medicamentele sunt metabolizate de produsele a 35 gene CYP (1, 2, 3 și mai puțin 4). De exemplu, codeina este metabolizată la morfină (un analgezic). Cei cu deficit al CYP2D6 nu resimt efectul analgezic al codeinei. Antidepresivele triciclice (nortriptilina), dacă sunt metabolizate rapid, au efect terapeutic minim, iar cei care le metabolizează insuficient resimt efectele secundare. Agenții chimici ce reglează contracțiile inimii induc efecte secundare, dacă nu sunt metabolizate suficient.

Bibliografie

Lehninger A. L. 1975. Biochimie, vol. I, Traducere după ediția a II-a, Editura Tehnică București.

Hoggard P. G., Sales S.D., Phiboonbanakit D., Lloyd J., Maher B. A., Khoo S. H., Wilkins E., Carey P., Hart C. A., Back D. J. 2001. Influence of Prior Exposure to Zidovudine on Stavudine Phosphorylation In Vivo and Ex Vivo – Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45(2): 577–582.

Kakuda T. N., Page L. M., Anderson P. L., Henry K., Schacker T. W., Rhame F. S., Acosta E. P., Brundage R. C., Fletcher C. V. 2001. Pharmacological Basis for Concentration-Controlled Therapy with Zidovudine, Lamivudine, and Indinavir – Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45(1): 236–242.

Bryant M. L., Bridges E. G., Placidi L., Faraj A., Loi A. G. and colab. 2001. Antiviral l-Nucleosides Specific for Hepatitis B Virus Infection – Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45(1): 229–235.

Cato A. III, Qian J., Hsu A., Levy B., Leonard J., Granneman R. 1998. Multidose Pharmacokinetics of Ritonavir and Zidovudine in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients – Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42(7): 1788–1793.

Schwartz S. A., Nair M. P. 1999. Current Concepts in Human Immunodeficiency Virus Infection and AIDS – Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 6(3): 295–305.

Zhou X. J., Sheiner L. B., D'Aquila R. T., Hughes M. D., Hirsch M. S., Fischl M. A., Johnson V. A., Myers M., Sommadossi J. P. 1999. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators, Population Pharmacokinetics of Nevirapine, Zidovudine, and Didanosine in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients – Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43(1): 121–128.

Acosta E. P., Balfour H. H. Jr. – Acyclovir for Treatment of Postherpetic Neuralgia: Efficacy and Pharmacokinetics 2001. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45(10): 2771–2774.

Bacon T. H., Levin M. J., Leary J. J., Sarisky R. T., Sutton D. 2003. Herpes Simplex Virus Resistance to Acyclovir and Penciclovir after Two Decades of Antiviral Therapy – Clin. Microbiol. Rev. 16(1): 114–128.

Gold D., Corey L. 1987. Acyclovir prophylaxis for herpes simplex virus infection – Antimicrobial Agents and Chemotherapy 31(3): 361–367.

Brady M. T., Sears S. D., Pacini D. L., Samorodin R., DePamphilis J., Oakes M., Soo W., Clements M. L. 1990. Safety and prophylactic efficacy of low-dose rimantadine in adults during an influenza A epidemic – Antimicrobial Agents and Chemotherapy 34(9): 1633–1636.

Noormohamed F. H., Youle M. S., Higgs C. J., Martin-Munley S., Gazzard B. G., Lant A. F. 1998. Pharmacokinetics and Absolute Bioavailability of Oral Foscarnet in Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Patients – Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42(2): 293–297.

Piret J., Lamontagne J., Désormeaux A., Bergeron M. G. 2001. Efficacies of Gel Formulations Containing Foscarnet, Alone or Combined with Sodium Lauryl Sulfate, against Establishment and Reactivation of Latent Herpes Simplex Virus Type 1 – Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45(4): 1030–1036.

Sjövall J., Bergdahl S., Movin G., Ogenstad S., Saarimäki M. 1989. Pharmacokinetics of foscarnet and distribution to cerebrospinal fluid after intravenous infusion in patients with human immunodeficiency virus infection – Antimicrobial Agents and Chemotherapy 33(7): 1023–1031.

De Cock K. M., Lucas S. B., Lucas S., Agness J., Kadio A., Gayle H. D. 1993. Clinical research, prophylaxis, therapy, and care for HIV disease in Africa – American Journal of Public Health 83(10): 1385–1389.
Gøtzsche P. 1993. Zidovudine dosage. Nordic Medical Research Councils' HIV Therapy Group – British Medical Journal 307(6905): 682–683.
Fischer P. B., Collin M., Karlsson G. B., James W., Butters T. D., Davis S. J., Gordon S., Dwek R. A., Platt F. M. 1995. The alpha-glucosidase inhibitor N-butyldeoxynojirimycin inhibits human immunodeficiency virus entry at the level of post-CD4 binding – Journal of Virology 69(9): 5791–5797.
Blazevic V., Jankelevich S., Steinberg S. M., Jacobsen F., Yarchoan R., Shearer G. M. 2001. Highly Active Antiretroviral Therapy in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Children: Analysis of Cellular Immune Responses – Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 8(5): 943–948.
Chun T. W., Justement J. S., Moir S., Hallahan C. W., Ehler L. A., Liu S., McLaughlin M., Dybul M., Mican J. M., Fauci A. S. 2001. Suppression of HIV replication in the resting $CD4^+$ T cell reservoir by autologous CD8 + T cells: Implications for the development of therapeutic strategies – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98(1): 253–258.
Takeda A., Robinson J. E., Ho D. D., Debouck C., Haigwood N. L., Ennis F. A. 1992. Distinction of human immunodeficiency virus type 1 neutralization and infection enhancement by human monoclonal antibodies to glycoprotein 120 – The Journal of Clinical Investigation 89(6): 1952–1957.
Cease K. B., Margalit H., Cornette J. L., Putney S. D., Robey W. G., Ouyang C., Streicher H. Z. 1987. Helper T-cell antigenic site identification in the acquired immunodeficiency syndrome virus gp120 envelope protein and induction of immunity in mice to the native protein using a 16-residue synthetic peptide – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84(12): 4249–4253.
Servais J., Lambert C., Fontaine E., Plesséria J. M., Robert I. 2001. Comparison of DNA Sequencing and a Line Probe Assay for Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance Mutations in Patients Failing Highly Active Antiretroviral Therapy – Journal of Clinical Microbiology 39(2): 454–459.
Ikuta K., Suzuki S., Horikoshi H., Mukai T., Luftig R. B. 2000. Positive and Negative Aspects of the Human Immunodeficiency Virus Protease: Development of Inhibitors versus Its Role in AIDS Pathogenesis – Microbiology and Molecular Biology Reviews 64(4): 725–745.
Hirsch M., Kaplan J. C., D'Aquila R. T. 1996. Antiviral Agents, în vol. Fields Virology, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.
Norkin L. C. 1995. Virus Receptors: Implications for Pathogenesis and the Design of Antiviral Agents – Clinical Microbiol. Rev., 8, 2, 1 : 293–315.
Bean B. 1992. Antiviral therapy: curent concepts and practices – Clin. Microbiol. Rev. 5, 146–182.
De Clercq E. 1997.In search of a selective antiviral chemotherapy – Clin. Microbiol. Rev. 10, 674—693.
Field, H. J., Vere Hodge R. A. 2007. Antiviral Agents, în vol. Encyclopedia of Virolgy, third edition, Editors Brian V. J. Mahy, Marc H. V. van Regenmortel, AP.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PARTEA A III-A. MICOLOGIE MEDICALĂ

28. NOŢIUNI INTRODUCTIVE DE MICOLOGIE

28.1. Caracterizarea generală a regnului Fungi

În prezent sunt descrise circa 70.000 de specii de fungi, deşi unele estimări sugerează că numărul este mult mai mare, putând să ajungă la aproximativ 1,5 milioane specii.

Din totalul celor peste 70.000 de specii descrise, mai puţin de 400 au importanţă medicală şi mai puţin de 50 produc mai mult de 90% din totalul infecţiilor fungice la om şi animale. Cele mai multe specii fungice sunt benefice pentru om şi sunt esenţiale pentru degradarea şi reciclarea materiei organice. Fungii au un rol deosebit de important în natură, deoarece, fiind în primul rând *descompunători ai materiei organice*, redau elementele biogene (C, H, O, N, S, P etc.) circuitului natural. Potenţialul degradativ al fungilor este foarte mare, datorită complexităţii şi diversităţii enzimelor pe care le secretă. Grupul fungilor descompune toate categoriile de macromolecule caracteristice lumii vii: polizaharide, acizi organici, lignine, hidrocarburi aromatice şi alifatice, zaharuri, alcooli, aminoacizi, purine, lipide, proteine, acizi nucleici. Descompunerea substratului necesită *acţiunea cooperantă* a mai multor specii de microorganisme.

Acţiunea degradativă a fungilor produce mari pierderi de fructe şi a altor produse vegetale în depozite. Fructele uscate (în special prunele) sunt vulnerabile la atacul fungic, deoarece suprafaţa lor e bogată în glucide. Cerealele depozitate şi furajele sunt deteriorate de fungi dacă nu sunt bine uscate la momentul depozitării.

Fungii au o importanţă economică de prim ordin, atât prin potenţialul lor distructiv, cât şi în *bioindustria micologică* (panificaţie, producerea antibioticelor, a acizilor organici etc.). Levurile sunt utilizate în *producerea industrială a băuturilor alcoolice de fermentaţie* (vin, bere, whisky) şi în *industria panificaţiei*, iar *Claviceps purpurea* (cornul secarei) este folosită ca sursă de medicamente (ergotina). Fungii paraziţi prezintă un *interes medical* major datorită frecvenţei mari a infecţiilor micotice (micoze) la om şi animale: *Pneumocystis* (produce pneumonia la persoanele imunosupresate), *Ajellomyces* (produce blastomicoza şi histoplasmoza), *Cryptococcus* (produce meningita la persoane imunodeprimate) etc.

Fungii *patogeni pentru plante* reprezintă un domeniu cu implicaţii teoretice, dar în special pentru producţia agricolă: ruginile, tăciunii, mălurile produc pierderi economice foarte mari în culturile de cereale. Fungii paraziţi pătrund în organismul vegetal prin înţepăturile insectelor, prin deschideri naturale (stomate) şi prin invazia directă a epidermei.

Unele ciuperci macroscopice sunt *comestibile*, altele sunt *otrăvitoare*, datorită toxinelor pe care le sintetizează. *Morchella* (zbârciogul) şi *Tuber* (trufe) sunt ascomicete comestibile. *Tuber* este o ciupercă sferică subterană, care creşte în jurul anumitor specii de stejar. Savoarea unică a acestor ciuperci le face să fie foarte căutate de gastronomi, deşi valoarea lor nutritivă este scăzută.

Dintre macromicete, *Agaricus bisporus* este cultivată în amenajări speciale.

Cei mai importanţi fungi din grupul deuteromicetelor aparţin genului *Penicillium*. Unele specii de *Penicillium* sunt producătoare de *penicilină*. Altele (*P. roqueforti* şi *P. camemberti*) conferă savoarea distinctă şi consistenţa moale a brânzeturilor de Roquefort şi Camembert, datorită proteazelor eliberate în substrat. Miceliul se dezvoltă preponderent la suprafaţă, dar pătrunde şi în substrat şi prin acţiunea sa enzimatică îi diminuează consistenţa şi îi conferă o savoare unică.

Fungii patogeni pentru om trăiesc în sol şi pătrund în organism pe cale respiratorie, fiind inhalaţi odată cu aerul. De la poarta de intrare, agentul infecţios se disemineză în organism şi se instituie o infecţie cronică, cu simptome foarte variate. Infecţiile fungice fatale sunt rare.

Nutriția. Majoritatea fungilor sunt organisme *saprobionte*, adică trăiesc pe materia organică vegetală în descompunere şi folosesc moleculele simple eliberate prin hidroliza macromoleculelor. Un număr important de fungi sunt *biotrofi* (adică trăiesc în relație directă cu alte organisme): unii realizează asociații simbiotice cu plantele (inclusiv cu algele), cu animalele (artropode) şi cu procariotele, rezultând licheni, micorize sau fungi endofitici din frunze şi tulpini. Circa 80% dintre plante au micorize. Fungii endofitici ar proteja plantele de ierbivore şi ar influența, prin sinteza fitohormonilor, biologia reproducerii.

Fiziologia fungilor prezintă următoarele trăsături generale:

- sunt strict aerobe;
- se adaptează la condiții de viață foarte severe: sunt mult mai plastice decât alte microorganisme, sunt rezistente la presiune osmotică ridicată şi cresc pe substraturi cu concentrații înalte de glucide pe care bacteriile nu le suportă;
- tolerează variații mari de pH (până la valoarea 9) al mediului şi cresc la concentrații înalte de acid (pH 2), cu valoarea optimă de 5,6;
- absorb apa din mediu şi din atmosferă, dar rezistă în medii deshidratate, inhibitoare pentru bacterii;
- temperatura optimă de creştere este de 22–30°; pot creşte şi la 0°; unele sunt termofile (62°);
- glucoza este zahărul metabolizat de toți fungii; sucroza, maltoza, amidonul, celuloza sunt metabolizate de mulți fungi filamentoşi;
- sursa de azot este amoniul, nitratul sau peptona;
- necesită P, Zn, Cu, Mg, Mo;
- sunt foarte eficiente în conversia nutrienților în material celular. Dacă nutrienții sunt în exces, fungii secretă diferite produse în mediul extracelular.

Cultivare. În laborator, fungii cresc pe medii naturale (mustul de malț, morcov, pâine) sau pe medii sintetice: Raulin, Sabouraud (dextroză-agar), Czapek.

Primul stadiu în formarea unei colonii pe suprafața unui mediu solid îl constituie apariția unor filamente miceliene în masa substratului solid. Pe măsură ce hifele devin tot mai dense, încep să apară hifele aeriene ale miceliului, care poartă organele de înmulțire. Datorită conidiilor care se formează în număr mare şi care de obicei sunt colorate (cenuşiu, negru, galben, brun, verde, albastru), coloniile apar colorate, iar miceliul este, de regulă, alb.

In vitro, creşterea fungică prezintă două tipuri morfologice distincte: cea de *levură* şi *forma filamentoasă*. Aparatul vegetativ al fungilor filamentoşi este reprezentat de o împletire de filamente denumite *hife*, cu diametrul de 2–10 μm, care formează miceliul.

Hifele care alcătuiesc miceliul constau fie din celule alungite, aşezate cap la cap, separate prin septe, cu unul sau doi nuclei (miceliu septat) sau hifa este formată dintr-o celulă unică, mult alungită ca un tub şi ramificată, nedivizată de septe, cu numeroşi nuclei. Un astfel de miceliu este denumit *coenocitic*. Ascomicetele (*Aspergillus, Penicillium*) de importanță medicală au rareori hife septate. Hifele care penetrează mediul şi absorb nutrienții se numesc *vegetative* sau de *substrat*. Hifele aeriene poartă structuri reproducătoare. *In vitro* formează colonii cu textură şi pigmentație caracteristice. Levurile şi fungii filamentoşi care sintetizează *pigmenți* melanici localizați în peretele celular sunt reuniți în grupul *dematiaceae*. Pigmenții conferă nuanța caracteristică atât coloniilor crescute pe mediul solidificat, cât şi leziunilor tegumentare.

Majoritatea fungilor filamentoşi izolați în clinică se pot determina pe criterii *morfologice* ale sporilor de reproducere asexuată (conidii), prin examenul microscopic.

Levurile sunt unicelulare, de formă sferică sau elipsoidală, cu diametrul de 3–15 μm şi se reproduc prin înmugurire. Unele specii formează muguri care nu se detaşează, se alungesc şi continuă procesul de înmugurire. Se formează astfel un lanț de celule alungite, denumite *pseudohife*. Coloniile de levuri sunt moi, opace, cu diametrul de 1–3 mm. Aspectul coloniilor şi morfologia microscopică a speciilor de levuri sunt asemănătoare. Din acest motiv, levurile se identifică prin *teste fiziologice*.

Fungii se reproduc pe cale asexuată şi sexuată (fig. 456). Reproducerea asexuată include propagarea vegetativă a hifelor şi a levurilor, precum şi prin formarea sporilor asexuați (fructificarea vegetativă). Hifele cresc printr-o zonă limitată a vârfului, unde peretele celular este subțire şi foarte elastic. Creşterea apicală poate fi însoțită de excrescențe laterale, acestea fiind primordiile hifelor laterale, care la rândul lor se pot ramifica.

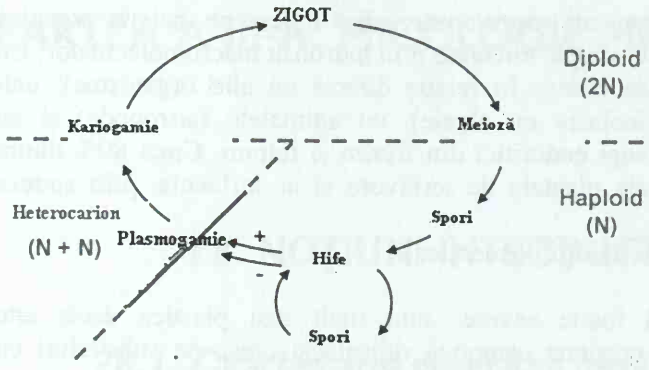


Fig. 456. Reprezentarea ciclului de viață sexuat şi asexuat la fungi (Gregory, 2006).

Unele specii de fungi sunt *dimorfice*: cresc ca levură sau ca hife filamentoase, în funcție de condițiile de mediu.

Fungii se înmulțesc prin spori, care se pot forma pe cale asexuată sau pe cale sexuată. Sporii sexuați se formează după procesul de încrucişare între cele două celule polarizate sexual.

Pentru formarea sporilor asexuați nu există celule polarizate sexual şi nici fuziune. Sporii se formează prin diviziune mitotică a unor celule specializate, pe hife miceliene denumite sporofori.

Levurile se reproduc asexuat prin *înmugurire*. Procesul începe cu formarea unei excrescențe pe celula mamă, ce creşte progresiv şi devine celula fiică (denumită blastoconidie). Istmul dintre cele 2 celule se rupe odată cu formarea peretelui septal. Unele levuri se propagă atât sub formă de levură, cât şi ca hife.

Diferențierea *sporilor asexuați* constituie forma de fructificare vegetativă. Pentru formarea sporilor asexuați, nu există celule polarizate sexual şi nici fuziune celulară. Sporii se formează prin *diviziune mitotică* a unor celule specializate, pe hife miceliene denumite *sporofori*. Sporii (conidii, sporangiospori, artrospori şi blastospori) sunt rezistenți la condițiile nefavorabile, se formează în culturi şi rareori se diferențiază în stadiul parazit. Morfologia sporilor asexuați este un criteriu de identificare.

La eumicete (fungi perfecți), sporii sexuați se formează prin procesul *fructificării sexuate*. Reproducerea sexuată urmează aceiaşi cale ca şi la organismele eucariote superioare: nucleii a 2 celule haploide *polarizate sexual*, fuzionează şi formează un *zigot diploid*. Nucleul diploid suferă diviziunea *meiotică* şi rezultă nuclei haploizi, în jurul cărora se diferențiază spori haploizi zigospori, ascospori şi bazidiospori.

Sporii pot fi exogeni şi endogeni. Sporii *exogeni* se formează pe hife denumite *conidiofori*. Celulele terminale ale conidioforului denumite *sterigme*, se divid în mod repetat prin înmugurire sau prin strangulare şi formează sporii denumiți *conidii*. Uneori, conidioforul este septat şi ramificat.

Sporii *endogeni* se formează pe un sporofor denumit *sporangiofor*, într-o structură terminală denumită *sporangiu*. Partea sporoforului care se inserează în sporangiu se numeşte *columelă*. Sporii rezultă prin diviziunea celulelor columelei în sporangiu şi se eliberează prin ruperea sau dizolvarea peretelui său.

Fungii imperfecți (deuteromicete) sunt aceia pentru care formele de fructificare sunt necunoscute sau lipsesc.

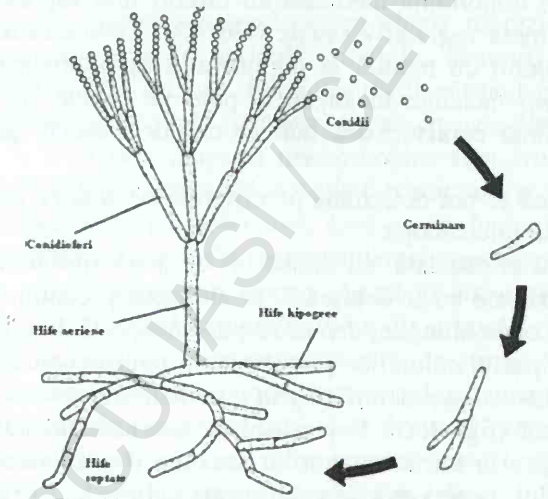


Fig. 457. Reprezentarea schematică a ciclului de multiplicare asexuată a unui fung cu miceliu septat, prin spori exogeni (CliffsNotes.com., 2010).

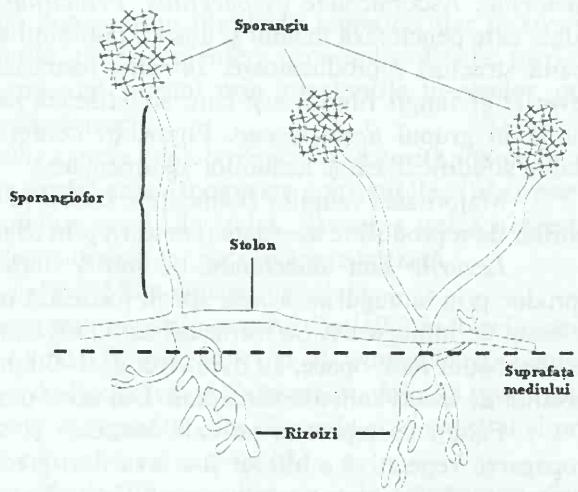


Fig. 458. Reprezentarea schematică a structurii zigomicetelor, care se reproduc prin endospori (SparkNote on Fungi, 2010).

Clasa *Chytridiomycota* cuprinde fungi filalamentoşi inferiori de apă, cu hife miceliene coenocitice, care se înmulţesc prin spori mobili (zoospori).

Clasa *Zygomycota* include fungii filamentoşi cu miceliu de obicei neseptat (*Mucor, Rhizopus*), care se înmulţesc prin spori endogeni sau conidii, formate pe hife specializate numite conidiofori, cu o varietate de forme. Coloniile fungice sunt afânate, de obicei pudrate, din cauza tendinţei de a creşte compact pe substrat şi sunt colorate la fel ca şi conidiile: negre, brune, galbene, verzi, verzi-albăstrui.

Ascomycota formează cel mai mare şi diversificat grup de fungi, cu circa 2000 de genuri. Grupul include *levurile* (*Saccharomyces, Candida*), *fungii filamentoşi (Aspergillus, Penicillium)* şi pe cei care produc majoritatea micozelor la om, boli caracteristice la plante denumite *făinări,* precum şi fungi cu pălărie: *Morchella* (zbârciogul) şi *Tuber* (trufele).

Majoritatea sunt specii terestre, dar un număr considerabil populează apele dulci sau sărate, saprobionte pe resturile vegetale în descompunere, iar unele sunt parazite sau trăiesc în asociaţii reciproc benefice, cu alte microorganisme sau cu unele plante.

Multe ascomicete saprobionte sunt foarte specializate şi cresc numai pe anumite părţi în descompunere ale unor specii de plante, iar cele parazite sunt restrânse la anumite ţesuturi ale gazdei (de exemplu, peţiolul frunzei). Un număr important de reprezentanţi ai grupului sunt paraziţi ai plantelor şi mai puţini ai insectelor sau altor animale.

Ascomicetele se reproduc pe cale sexuată şi asexuată. Caracteristica acestui grup de fungi este că *sporii sexuaţi*, denumiţi *ascospori*, se formează într-o structură în formă de sac, denumită *ască.*

Asca este o celulă care se formează prin procesul de fuziune a unor structuri tubulare a două celule învecinate haploide, polarizate sexual. Iniţial fuzionează numai masele citoplasmatice, prin procesul de *plasmogamie*. Plasmogamia poate fi rezultatul unirii a două celule similare sau hife, ori prin unirea heterogenă a două celule diferite, diferenţiate, denumite *gametangii*, unul mascul şi unul femel, sau a unui gametangiu femel cu o celulă masculină detaşată (spermatie).

Basidiomycota *sunt fungii cei mai evoluaţi. Miceliul este pluricelular şi se distinge prin organul sporifer denumit* bazidie, *în care se formează bazidiosporii.*

Grupul bazidiomicetelor include 20–30.000 de specii, cu morfologie diferită a talului, în funcţie de modul de viaţă: saprobionte sau parazite. Din acest grup fac parte fungii gelatinoşi, fungii care produc boli la plante (rugini, tăciuni, măluri), fungii consolă, care se dezvoltă pe scoarţa copacilor, fungii macroscopici comestibili şi necomestibili.

Denumirile comune se referă la partea vizibilă a ciupercii, denumită *bazidiocarp*, susţinut de un miceliu asimilator bine dezvoltat, care pătrund în substrat (solul sau materialele vegetale), pe care ciuperca fructifică.

Pe imaginile electrono-optice, peretele la *S. cerevisiae* este stratificat: un strat extern *fibrilar*, format în special din manoproteine, şi un strat *intern* amorf. Stratul intern poate să conste din 2 zone: una internă, în raport cu membrana, bogat în proteine, şi o zonă externă, bogată în manan.

Structura peretelui celulari

Din punct de vedere chimic, peretele constă din 3 componente de bază, interconectate: *β-glucanul, chitina* şi *mananul.*

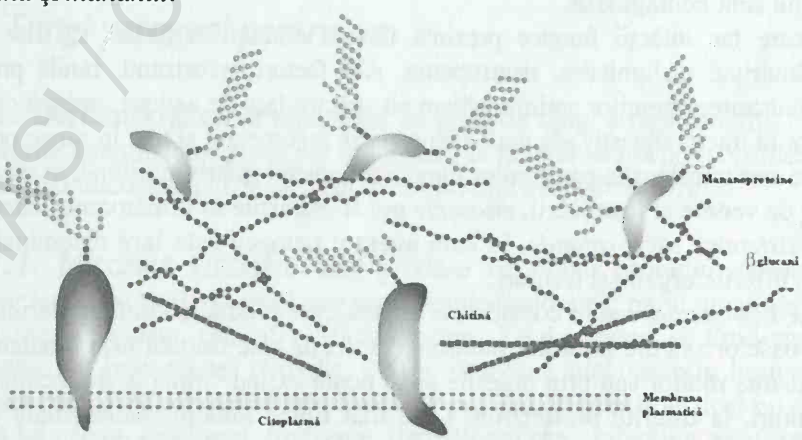


Fig. 459. Structura peretelui celular la fungi (Cummings şi Doering, 2009).

BCU IAŞI / CENTRALA UNIVERSITARĂ

Glucanul β-1,4 este un polimer linear format din unități de β-D-glucoză, ramificat cu resturi legate β-1,6. Este componenta principală a peretelui și formează rețeaua în care sunt ancorate manoproteinele (mananul). Glucanul determină rigiditatea peretelui și forma celulei.

Chitina este un polimer linear de β-1,4-N-acetilglucozamină, un component minor al peretelui. Lanțurile lineare de polizaharid se asociază cu fibrilele stratului extern, prin legături de H între resturile catenelor adiacente. Se formează astfel o structură cristalină a peretelui.

Deși, cantitativ minoră, prin depunerea sa specifică în regiunea septului, chitina este importantă pentru stabilitatea mecanică a joncțiunii temporare dintre celula mamă și celulele fiice. În celulele vegetative, chitina este limitată la inelul ce delimitează septul în celulele care înmuguresc sau în cicatricea pe peretele celulei mamă.

Mananul este un polimer format din unități de D-manoză (lipsește la fungii filamentoși), la care se asociază proteinele, clasificate în 2 grupe:

- manoproteine structurale ale peretelui celular;
- enzime localizate în peretele celular sau în spațiul periplasmic, cu rol trofic sau morfogenetic sau sunt implicate în procesul de secreție, ca invertaza sau fosfataza acidă.

Manoproteinele structurale ale peretelui celular sunt molecule mari, care conțin glucide în proporție de 95%. Componenta proteică are rol fundamental în procesul de biosinteză, ca acceptor al diferitelor catene glucidice.

La suprafața peretelui se găsesc structurile care mediază atașarea fungilor de celula gazdă. Polizaharidele parietale pot activa complementul și se eliberează anafilatoxinele stimulatoare ale procesului inflamator. Polizaharidele parietale ale fungilor sunt greu degradabile sub acțiunea enzimelor lizosomale.

28.2. Tipuri de infecții fungice

Fungii sunt agenți patogeni majori ai plantelor și insectelor, dar sunt mai puțin importanți ca agenți patogeni ai vertebratelor. Creșterea fungilor în țesuturile gazdelor animale și umane poartă denumirea generică de *micoză*. Gravitatea micozelor variază, de la cele care produc un disconfort minim, până la cele care periclitează viața, așa cum este aspergiloza invazivă.

Din punct de vedere epidemiologic, infecțiille fungice pot fi:

– *endemice*, provocate de fungi *patogeni primari* (*Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, Blastomyces* (produc coccidioidomicoza, histoplasmoza, respectiv blastomicoza);
– *oportuniste,* provocate de fungii oportuniști (produc micoze superficiale și profunde).

Majoritatea fungilor patogeni pentru om și animalele superioare sunt agenți infecțioși oportuniști exogeni, mediul lor de viață fiind apa, solul, resturile organice. Fungii invadează țesuturile organismelor cu potențial scăzut de apărare.

Infecția fungică a țesuturilor umane și animale se produce pe fondul unor condiții locale favorizante. Din această cauză, transmiterea infecției de la un organism la altul este rară. În general, maladiile fungice nu sunt contagioase.

Pacienții care fac infecții fungice prezintă un set comun de factori de risc: imunosupresia, chimioterapia, malnutriția, malignitatea, neutropenia. Alți factori favorizanți: rănile produse de arsuri, cateterizarea. Administrarea agenților antimicrobieni cu spectru larg de acțiune creează condiții favorabile expansiunii fungilor în tractul digestiv, de unde colonizează tegumentul și trec în sânge prin cateter venos. Altă cale de infecție este translocația patogenilor fungici din tractul gastro-intestinal, în sânge.

Din punct de vedere al localizării, *micozele* pot fi împărțite în următoarele categorii:

– infecții *sistemice* sau *profunde*, în care agentul patogen este larg diseminat în organism și crește în diferite organe și țesuturi;
– micozele *intermediare* sunt considerate acelea care produc leziuni epidermice, subcutanate, ale mucoaselor sau ale țesutului pulmonar. Infecția este inițiată prin inhalarea sporilor, prin contaminarea rănilor sau prin ingestie și se poate extinde dincolo de localizarea primară, în alte țesuturi, la diferite profunzimi. Cele mai tipice infecții intermediare sunt *candidoza, aspergiloza, mucormicoza, pneumocistoza*;

– micozele *superficiale* includ infecții tegumentare și ale fanerelor (păr, unghii). Fungii care produc infecții superficiale se numesc *dermatomicete*.

Clasificarea tipurilor de infecții are numeroase suprapuneri, deoarece micozele sistemice au manifestări cutanate și invers. Unii fungi produc numai un tip de infecție, iar altele produc toate cele 3 tipuri de infecție.

Infecțiile fungice apar frecvent, ca o consecință a eliminării microbiotei normale, prin terapie orală cu antibiotice. Micozele cu cea mai mare frecvență sunt *candidoza* și *dermatomicoza*, produse de fungi din microbiota normală. Câțiva fungi (*Cryptococcus neoformans, Coccidioides imitis, Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitides*) produc infecții pulmonare foarte asemănătoare cu tuberculoza prin manifestările clinice.

Persoanele care fac infecții fungice oportuniste au maladii de fond sau sunt imunocompromise.

Fungii patogeni nu produc toxine potente. Mecanismele patogenității sunt poligenice.

Grupul fungilor patogeni nu include *fungii alergici* și pe cei care *eliberează micotoxine* în substratul în care cresc. Aceste două categorii nu intră în grupul fungilor patogeni, pentru că nu produc maladii în sensul strict, adică nu sunt contagioși.

Capacitatea fungilor de a sintetiza toxine este variabilă în funcție de substratul pe care se dezvoltă. Sinteza toxinelor este asociată, în primul rând, cu sporogeneza.

Nu toți fungii produc micotoxine. Prezența organismelor competitive pare să fie importantă, deoarece microfungii cultivați în cultură pură în laborator, pierd potențialul toxic.

Pentru majoritatea fungilor patogeni nu se cunosc stadii de înmulțire sexuată și de aceea poziția lor sistematică este incertă.

Factorii de virulență ai fungilor sunt multipli și sunt reprezentați de structurile sau de particularitățile fizologice care creează un avantaj agentului infecțios în interacțiunea cu organismul gazdă:

– capacitatea de a crește la 37° și la pH fiziologic, pentru fungii care invadează țesuturile profunde;
– tranziția la forma parazitară este esențială pentru patogenitatea fungilor dimorfici. Unii fungi sunt patogeni sub formă de levură sau conidială (*Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatitidis*), iar alții trebuie să se comute la creșterea hifală pentru a-și exprima patogenitatea. Dimorfismul este controlat de sursa de N, pH, temperatură și de factori interni ai parazitului;
– capacitatea de a sintetiza enzime degradative (elastaza, alte proteaze);
– sinteza materialului capsular cu rol protector, antifagocitar (*Criptococcus neoformans*);
– sinteza factorilor de aderență la celulele gazdei;
– sinteza pigmentului melanină, catalizată de fenol-oxidază, o enzimă care distruge radicalii intermediari ai reducerii O_2 și $^1O_2$. Sinteza melaninei a evoluat ca un factor protector față de UV și de radiația ionizantă;
– sinteza toxinelor la *Cochliobolus*, un fung patogen pentru plante;
– în interacțiunea cu planta gazdă, patogenul fungic poate să producă o substanță care detoxifică compușii antifungici eliberați de sistemul radicular

28.3. Fungi patogeni pentru om

28.3.1. Dermatomicetele reprezintă un grup de fungi strâns înrudiți, care au capacitatea de a invada țesuturile keratinizate (piele, păr și unghii), la nivelul straturilor cornificate moarte, umane și animale, producând micoze superficiale (cutanate) numite *dermatomicoze*.

28.3.1.1. Micozele cutanate sunt produse de fungii grupului *dermatomicete* care au capacitatea de a infecta țesuturile keratinizate superficiale (epiderma, părul, unghiile). Cele circa 40 de specii sunt înrudite și aparțin genurilor *Microsporum, Trichophyton* și *Epidermophyton* (formele anamorfe, asexuate sau imperfecte) (Brooks, 2007). Procesul infecțios este limitat la stratul cornos superficial al epidermei, fapt explicabil prin aceea că *in vitro*, agenții infecțioși nu cresc la 37° și nici în prezența serului. Sunt cele mai frecvente dermatomicoze. Infecțiile sunt persistente, dar nu

periclitează viața. Speciile de dermatomicete capabile de reproducere sexuată aparțin genului *Arthroderma* (Weitzman şi col. 1986), familia *Arthrodermataceae*, ordinul *Onygenales*.

Dermatomicetele recunoscute în prezent şi speciile nepatogene (tabelul 70) se disting de alte specii de fungi prin faptul că prezintă o rezistență înaltă la cicloheximidă şi au capacitatea de a utiliza *proteinele* ca unică sursă de carbon, eliberând ioni de amoniu în exces care determină alcalinizarea mediului.

Tabelul 70.

Dermatomicetele şi speciile înrudite nepatogene, formele teleomorfe şi anamorfe.

Forma teleomorfă	*Forma anamorfă*
Arthroderma sp.	*Microsporum* şi *Tricophyton*
A. benhamiae	T. mentagrophytes
A. cajetani	*M. cookei*
A. fulvum	*M. fulvum*
A. grubyi	*M. vanbreuseghemii*
A. gypseum	*M. gypseum*
A. incurvatum	*M. gypseum*
A. otae	*M. canis*
A. obtusum	*M. nanum*
A. persicolor	*M. persicolor*
A. racemosum	*M. racemosum*
A. simii	*T. simii*
A. vanbreuseghemii	*T. mentagrophytes*

În funcție de *habitatul* obişnuit, dermatomicetele se clasifică în *geofile* (în sol), *zoofile* (la animale) şi *antropofile* (la om) (tabelul 71). Speciile antropofile produc cel mai mare număr de micoze persistente la om, greu de vindecat. Cele geofile şi zoofile sunt mai puțin adaptate la existența în țesuturile umane, produc procese inflamatorii mai ample şi sunt eliminate mai uşor.

Tabelul 71.

Ecologia speciilor comune de dermatomicete.

Specia	Habitatul natural	Incidența infecției
Epidermophyton floccosum	Om	Crescută
Trichophyton rubrum	Om	Crescută
Trichophyton interdigitale	Om	Crescută
Trichophyton tonsurans	Om	Medie
Trichophyton violaceum	Om	Medie
Trichophyton concentricum	Om	Redusă
Trichophyton schoenleinii	Om	Redusă
Trichophyton soudanense	Om	Redusă
Microsporum audouinii	Om	Medie
Microsporum ferrugineum	Om	Medie
Trichophyton mentagrophytes	Şoarece, rozătoare	Medie
Trichophyton equinum	Cal	Redusă
Trichophyton erinacei	Arici	Redusă
Trichophyton verrucosum	Vite	Redusă
Microsporum canis	Pisică	Medie
Microsporum gypseum	Sol	Medie
Microsporum nanum	Sol/porc	Redusă
Microsporum cookei	Sol	Redusă

Speciile geofile sunt considerate strămoşii speciilor patogene de dermatomicete. Habitatul acestor specii este *solul*, fiind asociate cu materialele keratinizate în descompunere (păr, pene, coarne, copite, unghii etc.). Contactul direct cu solul este principala sursă de infecție a omului şi a animalelor. Transmiterea speciilor geofile de la animale la om sau de la om la om este rară. Unul dintre cele mai bune exemple de dermatomicete geofile este *Microsporum gypseum*, agentul etiologic a două afecțiuni neobişnuite asociate cu solul. Una dintre acestea apare la muncitorii din sere, care lucrează cu sol fertilizat. Cea de a doua infecție apare la copiii şi adulții care intră în contact cu muncitorii infectați din sere.

Speciile zoofile au evoluat din speciile geofile şi au pierdut capacitatea de a supraviețui timp îndelungat în sol. În mod obişnuit, speciile zoofile sunt asociate cu o anumită gazdă sau un număr limitat de gazde, în afara cărora se găsesc în cazuri excepționale. Dermatomicetele zoofile cresc rareori ca saprobionte, dar supraviețuiesc în stare latentă în materialele de origine animală. Infecțiile umane sunt rezultatul, fie al unui contact direct cu animalul infectat, fie al unuia indirect, cu materiale aparținând animalelor infectate. *Microsporum canis, Trichophyton verrucosum* şi *T. mentagrophytes* produc impetigo la animale, dar frecvent sunt asociate cu infecții umane. *M. canis* infectează animalele domestice, în special pisica, câinele şi calul, care disemineză conidiile infecțioase în mediul încojurător, producând astfel infecțiile familiale. Copiii cu vârste între 5–14 ani sunt mult mai sensibili decât adulții. Infecțiile omului cu *M. canis*, provin de la câine şi de la pisică.

Evoluția de la viața saprobiontă din sol, la colonizarea țesuturilor umane se corelează cu descreşterea sau chiar cu pierderea capacității de a forma conidii şi de a se reproduce sexuat. Pierderea reproducerii sexuate se observă la aproape toate dermatomicetele antropofile, cu toate că un număr mic de membri ai complexului *Trichophyton mentagrophytes* (izolatele de *T. interdigitale*), păstrează această cale de reproducere (*Arthroderma benhamiae* sau *A. vanbreuseghemii*).

Scăderea sau pierderea capacității de a forma conidii şi a capacității de a se reproduce sexuat, este corelată cu faptul că speciile antropofile de dermatomicete tind să producă infecții cronice, care nu se vindecă spontan. Formarea macroconidiilor caracteristice, *in vitro*, în mediul de creştere, oferă dovada existenței saprobionte, deoarece conidiile nu se formează în gazdele infectate.

Diagnosticul se pune prin examinarea microscopică a firelor de păr, a raclajului tegumentar de la periferia leziunii şi a unghiilor, unde se observă creşterea hifală şi lanțuri de conidii. Proba de raclaj tegumentar se recoltează de la periferia leziunii, deoarece procesul infecțios-lezional progresează centrifug.

Proba se examinează pe lamă, în picătură de soluție 10–28% de KOH, cu sau fără calcofluor, un colorant specific al peretelui celular fungic. Preparatul se examinează la microscopul cu fluorescență. În raclajul tegumentar şi al unghiei se observă hife ramificate şi lanțuri de conidii. *Microsporum* formează teci de spori în jurul firului de păr.

Identificarea morfologică a dermatomicetelor urmează în prezent schema lui Emmons, care se bazează în special pe caracterele microscopice ale anamorfelor şi pe morfologia coloniilor crescute pe mediul Sabouraud, cu cicloheximidă şi cloramfenicol, după incubarea la 25° timp de 2 săptămâni. Pentru stimularea formării conidiilor este necesară adăugarea extractului de levuri 1%, sau folosirea unor medii cu cartof sau făină de porumb.

Se examinează atât culoarea aversului coloniilor, cât şi a reversului, prezența pigmentului difuzibil, textura suprafeței şi rata de creştere. Foarte importante pentru identificare sunt tipul de conidii, forma, mărimea şi aranjamentul acestora, ca şi prezența altor structuri, ca de pildă hife pectinate, încolăcite şi în formă de corn de cerb, a clamidosporilor şi organelor nodulare.

Numeroase dermatomicete, în special cele asociate cu alte gazde, produc de regulă două tipuri de conidii: *macroconidii multicelulare* şi *microconidii unicelulare*. Tipul conidial şi textura suprafeței macroconidiilor (rugoase sau netede) prezintă importanță taxonomică.

Speciile de *Trichophyton* formează colonii albe sau crem, cu marginile netede şi reversul pigmentat în galben brun sau roşu brun, macroconidii cilindrice cu suprafață netedă şi microconidii caracteristice.

Epidermophyton produce pe agar Sabouraud colonii cu creştere lentă, gri-maronii, sau verde închis, cu marginile netede, cu pigment galben-*maroniu* pe revers. Coloniile vechi sunt albe. Textura este fină, catifelată. Macroconidiile cu perete subțire, netede, sunt alungite şi adesea grupate în clusteri, care cresc direct pe hife (fig. 460). Microconidiile sunt absente (Rebell şi Taplin, 1970, Rippon, 1988). Omul este gazda principală pentru *E. floccosum,* singura specie patogenă, determinând infecții la om. Atacă tegumentul, unghiile şi foarte rar părul. Este specia cea mai comună şi produce *tinea pedis, tinea cruris* şi ocazional *tinea unguium,* dar nu invadează firul de păr. Cea de a doua specie, *Epidermophyton stockdaleae*, nepatogenă, este rezidentă în sol.

Majoritatea speciilor de *Microsporum* sunt larg răspândite, puține fiind cele care au o distribuție geografică limitată. Unele specii de *Microsporum* pot fi izolate atât din sol, cât şi de la animale (specii geofile şi zoofile) (tabelul 72).

Fig. 460. Epidermophyton floccosum. Aspectul coloniei pe mediu Sabouraud cu dextroză. Macroconidii alungite, care cresc direct de pe hife şi clamidiospori sferici, prezenţi în cutura îmbătrânită (Mycology online, www.mycology.adelaide.edu.au).

Speciile acestui gen produc *macroconidii, microconidii* şi *clamidospori.*

Macroconidiile sunt hialine, multiseptate şi variază ca formă, de la obovate la cilindro-fusiforme; pot avea pereţii groşi sau subţiri şi între 1–15 septe în funcţie de specie. Caracteristica distinctivă esenţială este că *macroconidiile* prezintă pereţii rugoşi sau echinulaţi. Dimensiunile variază de la 7–20 µm până la 30–160 µm. Macroconidiile şi asperităţile caracteristice ale suprafeţei se formează pe medii speciale. Forma lor, dimensiunile şi caracteristicile peretelui celular sunt importante pentru identificarea speciilor.

Tabelul 72.

Habitatul natural al speciilor de *Microsporum.*

Nr. crt.	Specia	Habiatatul/ Rezervorul natural
1.	*Microsporum audouinii*	Antropofil
2.	*Microsporum canis*	Zoofil (câini, pisici)
3.	*Microsporum cookei*	Geofil; izolat şi din blana câinilor, pisicilor, rozătoarelor
4.	*Microsporum ferrugineum*	Antropofil
5.	*Microsporum gallinae*	Zoofil
6.	*Microsporum gypseum*	Geofil; izolat şi din blana rozătoarelor
7.	*Microsporum nanum*	Geofil şi zoofil (porc)
8.	*Microsporum persicolor*	Zoofil (şoarece de câmp)

Microconidiile sunt de regulă hialine, unicelulare, piriforme până la clavate, cu pereţii netezi, de 2,5 –3,5 µm până la 7µm şi nu au valoare de diagnostic.

La microscop se examinează atât structura, cât şi aranjamentul ambelor tipuri de conidii.

Membrii acestui gen, de regulă, atacă pielea şi părul şi numai ocazional unghiile.

Gruby a descoperit invazia ectotrihă a părului scalpului şi a celui din barbă a unor pacienţi, agentul etiologic fiind denumit *Microsporum audouinii.*

Separarea acestui gen de *Trichophyton* se bazează pe faptul că macroconidiile au pereţii rugoşi, cu toate că acest caracter este greu de observat.

Au fost descrise 17 specii de *Microsporum*, cele mai importante fiind *M. audouinii, M. canis, M. cookei, M. distortum, M. ferrugineum, M. gallinae, M. gypseum, M. vanbreuseghemii* (tabelul 73).

Tabelul 73.

Caracteristicile speciilor patogene de *Microsporum* în cultură.

Nr. crt.	Specia	Caractere macroscopice ale coloniei/ mediu Sabouraud	Caractere microscopice	
1.	*Microsporum audouinii*	Suprafaţa albă, gri sau cafenie-roşiatică, plană sau catifelată; reversul ruginiu; creştere moderată.	Macroconidii fusiforme, alungite, pereţi groşi rugoşi, septuri dispuse neregulat, microconidii clavate, formate de-a lungul hifelor, hife pectinate, clamidospori terminali sau intercalari. Microconidii rare, măciucate	Nu perforează firul de păr *in vitro.* Coloraţie maronie pe mediu cu orez şi creştere săracă.
2.	*Microsporum canis (M. canis var. distortum)*	Suprafaţa albă, pufoasă, lânoasă; reversul galben, portocaliu până la maroniu; fără pigment; creştere rapidă.	Numeroase macroconidii, fusiforme cu pereţii groşi, rugoşi, 18–125 x 5–27µm, mai mult de 15 septuri, protuberanţă la vârf, câteva microconidii în formă de măciucă frecvente. *M. canis var. distortum* macroconidii deformate cu pereţii groşi, rugoşi.	Sporulează greu pe mediu cu orez; perforează firul de păr *in vitro.*
3.	*Microsporum cookei*	Suprafaţa galbenă, cafenie-roşiatică sau, pulverulentă sau granulară; reversul roşu; creştere moderată.	Numeroase macroconidii, elipsoidale, cu pereţii groşi; unele cu pereţii moderat subţiri, asemănător cu *M. gypseum*; microconidii abundente.	
4.	*Microsporum ferrugineum*	Suprafaţa galbenă până la ruginie, pliată, de consistenţa cerii; creştere foarte lentă.	Hife neregulate, cu septe proeminente (aspect de tulpină de bambus), lipsite de conidii.	Nu perforează firul de păr *in vitro.*
5.	*Microsporum gallinae*	Suprafaţa albă până la roz deschis, uşor pliată; reversul roşu deschis, pigment difuzibil; creştere rapidă.	Macroconidii alungite, curbate, cu marginile tocite, netede cu uşoare asperităţi la margini; între 2–10 celule, cu 6–8 x 15–20µm; Microconidii prezente.	Pigment roşu difuzibil caracteristic; nu perforează firul de păr *in vitro.*
6.	*Microsporum gypseum* (fig. 461) *Microsporum fulvum*	Suprafaţa cafenie-roşiatică, pulverulentă; reversul maroniu-roşcat; creştere rapidă.	Macroconidii numeroase elipsoidale până la fusiforme, 25–60 x 7–15µm, pereţi rugoşi subţiri, mai mult de 6 septuri; microconidii abundente.	
7.	*Microsporum nanum*	Suprafaţa crem până la cafenie-roşiatică, pulverulentă; reversul maro-roşiatic; creştere moderată.	Macroconidii abundente ovoide sau în formă de ou, cu 1–3 celule; 10–30 x 6 x 13µm; microconidii rare sau moderate.	
8.	*Microsporum persicolor*	Suprafaţa galbenă aurie, prăfoasă sau pufoasă; reversul roz până la roşcat-maroniu.	Microconidii sferice abundente; aglomerări în mod obişnuit, clavate până la formă de pară; macroconidii clavate, netede, cu pereţii subţiri, pereţii rugoşi cu vârsta sau pe medii speciale; adesea sunt prezente hife în formă de spirală.	

BCU IAŞI - CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

9.	*Microsporum praecox*	Suprafața galbenă, prăfoasă până la pufoasă; reversul galben pal până la portocaliu; creștere moderată.	Macroconidii numeroase lungi, fusiforme, 40–90 x 7 x17 µm, macroconidii mici, netede sau spinoase, 2–8 septe; microconidii absente.	
10.	*Microsporum racemosum*	Suprafața bej-crem, granulară; plană; reversul roșu aprins; creștere rapidă.	Macroconidii numeroase, fusiforme, elipsoidale, 41–77 x 9–10 µm; se aseamănă cu M. gypseum; microconidii pedunculate numeroase, în aglomerări asemănător unui strugure (racem).	Perforează firul de păr *in vitro*. Rareori patogen.
11.	*Microsporum vanbreuseghemii*	Suprafața galbenă, crem sau roz; prăfoasă până la pufoasă; reversul galben pal.	Numeroase macroconidii cilindro-fusiforme, 44–87 x 11µm; până la 12 septe, pereți groși netezi până la spinoși; numeroase microconidii.	Perforează firul de păr *in vitro*. Rareori patogen.

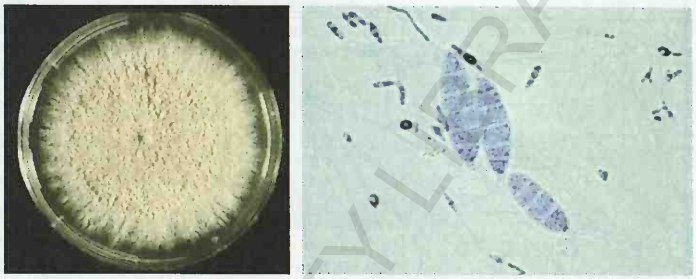


Fig. 461. Microsporum gypseum- aspectul coloniei pe mediu Sabouraud cu dextroză, macroconidii alungite, microconidii piriforme (Mycology online, www.mycology.adelaide.edu.au).

Genul ***Trichophyton*** cuprinde peste 20 de specii de dermatomicete antropofile, zoofile şi geofile, cele mai comune fiind *Trichophyton mentagrophytes, T. schoenleinii, T. rubrum, T. tonsurans, T. verrucosum* şi *T. violaceum.*

Pentru diferențierea şi identificarea speciilor de *Trichophyton* se folosesc numeroase caractere morfologice şi fiziologice. Reprezentanții genului sunt lipsiți de stadiul sexuat, fiind astfel incluşi în *Fungi Imperfecti.*

Morfologie. Rata de creştere a coloniilor de *Trichophyton* este lentă până la moderată. Textura este ceroasă, glabră până la pufoasă. Aversul este alb spre galben-bej sau roşu violet. Reversul este pal, galben, maro sau maro-roşiatic (tabelul 74). Este parazit pe pielea omului şi a animalelor, dar poate fi izolat şi din sol.

La nivel microscopic, prezintă o gamă largă de elemente structurale: macroconidii cu perete neted, microconidii şi artroconidii, hife septate, hialine, hife spiralate, hife asemănătoare tulpinii de bambus, hife pectinate, hife în formă de coarne de cerb (candelabre favice), celule hifale „în rachetă", organe nodulare. Microconidiile, mult mai numeroase decât macroconidiile, sunt uniceluare, având formă sferică sau piriformă. Sunt numeroase, solitare sau grupate, sesile sau cu pedunculi scurți. Microconidiile sunt adesea tipul predominant de conidii produs de genul *Trichophyton.*

Macroconidiile sunt multicelulare, multiseptate, având două sau mai multe celule, cu pereții netezi, groşi sau subțiri, prezentând formă cilindică, clavată, de creion sau de țigară. Acestea, de obicei, sunt produse într-un număr redus. Unele specii pot fi sterile, fiind necesare medii speciale pentru a le induce sporularea.

Modul de aranjare pe hifele fertile reprezintă unul dintre cele mai importante criterii de identificare.

Genul Trichophyton cuprinde specii antropofile, zoofile şi geofile. Unele specii sunt cosmopolite, în timp ce altele au o distribuție geografică limitată. *Trichophyton* produce infecții ale părului, pielii şi unghiilor la om. Majoritatea speciilor de *Trichophyton* prezintă forme *teleomorfe*, care sunt clasificate în genul *Arthroderma.*

Dintre speciile antropofile de *Trichophyton*, *T. rubrum* produce *tinea unguium, cruris şi pedis. In vivo* această specie invadează foarte rar părul. Este răspândită global, infectează toate populațiile umane şi a devenit mai frecventă în populațiile urbane, în special în țările dezvoltate, o dată cu folosirea încălțămintei acoperite, care menține căldura şi umiditatea. În India, *T. rubrum* produce *tinea corporis* la femei şi *tinea cruris* la bărbați; produce de asemenea infecții cronice.

T. mentagrophytes var. interdigitale, membru al complexului *T. mentagrophytes* (fig. 462) produce frecvent *tinea pedis* şi *tinea cruris* şi nu invadează părul *in vivo.*

Arthroderma simii (teleomorfa speciei *Trichophyton simii*), produce sporadic impetigo la câine, la maimuțe şi la om în India.

Tabelul 74.

Caracteristicile celor mai comune specii patogene de *Trichophyton* în cultură.

Nr.crt	Specia	Caractere macroscopice ale coloniei pe mediu Sabouraud.	Caractere microscopice	Alte caractere.
1.	*Trichophyton concentricum*	Suprafaţa crem sau maro; încreţită, glabră sau catifelată; creştere foarte lentă.	Conidii absente, hife sterile, hife în formă de corn de cerb.	50% dintre izolate sunt stimulate de tiamină; distribuţie geografică limitată.
2.	*Trichophyton equinum*	Suprafaţa albă, pufoasă, în formă de cupolă; iniţial netedă, ulterior încreţită; reversul galben până la maroniu-roşiatic; creştere moderată.	Microconidii abundente, sferice, piriforme, alungite, formate de-a lungul hifelor, ocazional în mici aglomerări; macroconidii rare, clavate, cu pereţi netezi.	Necesită acid nicotinic; anumite izolate perforează firul de păr *in vitro*.
3.	*Tricophyton erinacei*	Suprafaţa albă, pudrată, plană; pigment galben pe revers; creştere rapidă.	Microconidii clavate, piriforme, de-a lungul hifelor, izolate sau aglomerate; macroconidii rare clavate, cilindrice, netede, cu pereţi subţiri.	Perforează firul de păr *in vitro*.
4.	*Trichophyton interdigitale* (subtipul antropofil	Suprafaţa albă-crem, pufoasă, reversul cafeniu-roşiatic;	Microconidii puţine, piriforme, de-a lungul hifelor.	
5.	*Trichophyton megninii*	Suprafaţa rozalie, catifelată; pliuri radiale; reversul roşu aprins, creştere moderată.	Microconidii abundente piriforme, macroconidii rare în formă de creion, netede.	.
6.	*Trichophyton mentagrophytes*	Suprafaţa crem, cafeniu-roşiatic până la roz; pudrată – granulară, plană; reversul roşu sau roşu-maroniu; creştere rapidă.	Microconidii sferice abundente în grămezi; macroconidii cu pereţii netezi, clavate, în formă de creion, hife spiralate adesea prezente.	Perforează firul de păr *in vitro*
7.	*Trichophyton rubrum*	Suprafaţa tipic albă, catifelată până la pufoasă, ocazional pudrată – granulară; reversul de culoarea vinului roşu, rar galbenă sau maro; pigment difuzibil; creştere moderată sau lentă.	Microconidii puţine/numeroase, piriforme; macroconidii rare în izolatele pufoase, numeroase, în formă de creion, clavate în coloniile granuloase, pudroase; 15–30 x 4–6 µm.	Testul de perforare a firului de păr *in vitro* negativ.
8.	*Trichophyton schoenleinii*	Suprafaţa glabră, ceroasă, cerebriformă devine catifelată, albă, gri sau cafeniu-roşiatic; creştere foarte lentă, sparge mediul.	Conidiile lipsesc în mod obişnuit; microconidii în culturile vechi catifelate; hife în formă de coarne de cerb; clamidospori şi hife cu umflături frecvente.	Creştere egală la 25°C şi 37°C, ceea ce îl diferenţiază de *T. verrucosum*.
9.	*Trichophyton simii*	Suprafaţa albă, crem, pudrată, granulară; reversul de culoarea paiului; creştere rapidă.	Macroconidii clavate, fusiforme, cilindrice, abundente, cu pereţii subţiri; clamidospori intercalari; microconidii piriforme, solitare, de-a lungul hifelor; pot fi prezente şi spirale.	Seamănă cu *T. mentagrophytes*, dar produce un număr neobişnuit de mare de macroconidii în izolatele cultivate de mai multe ori.
10.	*Trichophyton soudanense*	Suprafaţa plană, galbenă până la roşu mat, cu margini stelate în izolatele primare.	Macroconidii absente, puţine microconidii clavate,/absenţe; ramificaţii la nivelul hifelor.	Pot avea/nu nevoie de vitamine.
11.	*Trichophyton tonsuras*	Suprafaţa albă, crem, galben pal, maroniu-roşiatic, roz, pudrată, catifelată, plană sau ridicată şi încreţită; reversul maroniu-roşiatic; creştere lentă.	Microconidii numeroase, clavate, elongate, unele dilatări, variabile ca dimensiuni şi forme; macroconidii rare, cilindrice, netede, cu pereţii subţiri.	Creştere stimulată de tiamină; perforarea firului de păr este variabilă.
12.	*Trichophyton verrucosum*	Suprafaţa de culoare crem, maroniu-rosiatică, plană, catifelată, albă, glabră, pufoasă; creştere foarte slabă.	Conidii absente în mod normal; microconidii clavate; macroconidii neregulate; clamidospori caracteristici în lanţuri (şirag de perle).	Aproximativ 16% din izolate necesită tiamină şi inozitol; creştere stimulată la 37°C.
13.	*Trichophyton violaceum*	Suprafaţa de culoare violetă, glabră; creştere foarte lentă; pot aparea şi variante glabre albe.	Conidii tipic absente, excepţie cele cultivate pe medii îmbogăţite cu tiamină; hife neregulate şi clamidospori.	Creştrea şi sporularea sunt stimulate de tiamină.

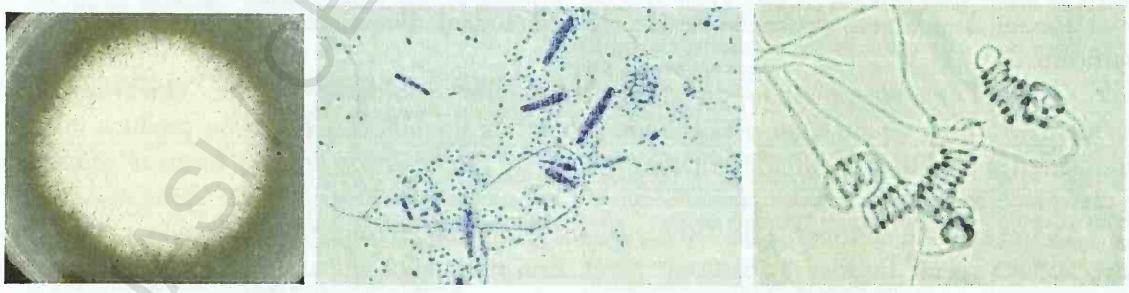


Fig. 462. T. mentagrophytes. Aspectul coloniei pe mediu Sabouraud cu dextroză, macroconidii alungite, microconidii sferice şi hife spiralate caracteristice (Mycology online, www.mycology.adelaide.edu.au).

Infecţiile produse de dermatomicete – tinea, impetigo – sunt clasificate clinic pe baza localizării leziunilor pe suprafaţa corpului. Procesul infecţios poate să se dezvolte în diferite zone ale corpului şi este rezultatul inoculării locale. Dermatomicetele cresc centrifug, formând inele neregulate cu margini inflamatorii, cu unele zone clare în centrul leziunii. Denumirea de *impetigo* se bazează pe

aspectul leziunilor, asemănătoare unui vierme inelat, cu margini neregulate. Infecțiile sunt denumite după regiunea corpului, folosind termenul latin *tinea* (molie) și după asemănarea efectului moliilor asupra hainelor de lână, cu leziunile dermatomicetelor pe piele. Manifestările clinice sunt clasificate astfel: *tinea pedis* (la nivelul piciorului) (fig. 463), *tinea cruris*, *tinea corporis* (pielea glabră), *tinea barbae* (la nivelul bărbiei și al mustății), *tinea capitis* (scalp, sprâncene, gene), *tinea manum* (la nivelul mâinii), *tinea unguium* (la nivelul unghiilor) (fig. 464), *tinea favosa* (favus) și *tinea imbricata* (impetigo determinată de *T. concentricum*). Tinea se transmite prin intermediul pielii descuamate de la nivelul piciorului, care poate ajunge pe covor.

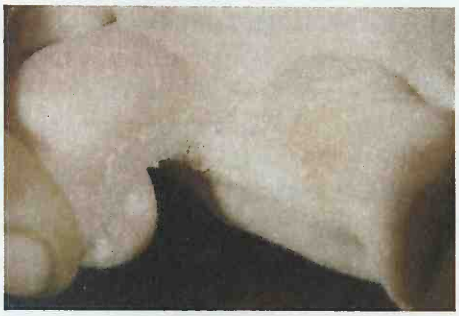


Fig. 463. Tinea pedis – aspectul leziunilor (http://hardinmd.lib.uiowa.edu/cdc/athletesfoot.html). *Tinea unguium* (infecția unghiilor) poate să fie consecutivă infecției prelungite cu *Tinea pedis*.

Fig. 464. Tinea unguium – aspectul leziunilor. (http://supercurso.sld.cu/supercursos/plonearticlemultipage.2006–05–05.8777394061/tinea-unguium).

Infecțiile sunt dobândite prin contactul tegumentului lezat, cu solul sau cu organismele infectate (animale și om). Fungii antropofili se pot transmite direct cu obiectele contaminate (îmbrăcăminte). Sensibilitatea gazdei la infecție crește în condiții de umiditate, căldură, factori chimici specifici ai tegumentului (compoziția sebumului și perspirația), vârsta tânără, predispoziția genetică. Micozele cutanate poartă denumirea clinică de *tinea*, cu diferite localizări.

Tinea pedis (piciorul de atlet) este cea mai frecventă dermatomicoză, localizată în tegumentul degetelor și al tălpii piciorului. Se manifestă prin prurit intens și apariția unor vezicule mici care se sparg și eliberează un lichid limpede, neinfiltrat cu leucocite. Straturile cornoase ale epidermei se macerează și astfel sunt expuse straturile bazale, unde se pot iniția infecții bacteriene. Agenții etiologici cei mai comuni ai acestei forme de tinea, în infecțiile cronice sunt reprezentați de *Epidermophyton floccosum, T. interdigitale* și *T. rubrum*.

Tinea corporis (fig. 465), *T. cruris* (cu localizare inguinală), *T. manum* cresc în straturile de celule keratinizate și moarte ale epidermei. Sunt produse de *T. rubrum* și *E. floccosum*. Leziunile sunt, de obicei, infecții bilaterale, eritematoase și solzoase, cu margini inflamate, adeseori cu erupție veziculară. Metaboliții, enzimele și antigenele fungilor difuzează prin straturile viabile ale epidermei și provoacă formarea veziculelor și senzația intensă de prurit.

Fig. 465. Tinea corporis, manus, cruris, barbae – aspectul leziunilor. (http://supercurso.sld.cu/supercursos/plonearticlemultipage.2006–05–05.8777394061/tinea-corporis /tinea-cruris//tinea-barbae, Lam, 2008).

Tinea capitis (*Microsporum augouinii, M. canis, M. ferrugineum, M. gypseum. T. verrucosum* și *T. megninii*) și *T. barbae* (*T. mentagrophytes* și *T. erinacei*) sunt dermatomicoze localizate în părul și în epiderma scalpului și respectiv, în zona bărbiei. Infecția începe cu invazia stratului keratinizat al tegumentului și progresează pe suprafața firului de păr. Infecția este inițiată chiar deasupra rădăcinii

părului şi progresează cu o rată egală cu rata creşterii firului de păr. Tipul de infecţie a firului de păr poate fi atât endotrih, cât şi ectotrih. În infecţia ectotrihă ((*Microsporum augouinii, M. canis, M. ferrugineum, M. gypseum. T. verrucosum* şi *T. megninii*), fungul infectează firul de păr la mijlocul foliculului formând astfel o teacă de hife şi artroconidii cu diametrul de 2–3µm, care înconjură firul de păr. Firul de păr infectat devine mai puţin viguros, fragil, rupându-se la nivelul scalpului şi dă impresia unei alopecii parţiale. În invazia endotrihă (*T. tonsurans, T. violaceum* şi *T. soudanens*), hifele invadează foliculul pilos, cresc în interiorul firului de păr, formează numeroase artroconidii şi deteriorează firul de păr. Firul de păr infectat devine alb-gri şi se rupe uşor de la nivelul scalpului. *Tinea capitis* poate astfel să genereze o manifestare clinică mai amplă – *tinea favosa /favus*, datorită inflamaţiei acute a foliculului pilos. Este o dermatomicoză rară, produsă de *T. schoenleini.* Procesul inflamator lezional produce cruste, numite "godeu favic" sau scutule. Infecţiile de durată pot duce la alopecie.

Tinea unguium (onicomicoza) este produsă de *T. rubrum, T. interdigitale* şi *E. floccosum.* Infecţia este localizată în patul unghiei şi părţile laterale ale unghiei.

Pityriasis (Tinea) versicolor (fig. 466) este o infecţie superficială a stratului cornos, cauzată de *Malassezia furfur complex.* Invazia pielii cornificate şi răspunsul gazdei sunt minime. Pe tegument apar macule hiper- sau hipopigmentate. *Malassezia* este o levură lipofilă şi necesită prezenţa lipidelor în mediul de creştere.

Fig. 466. Pityriasis (Tinea) versicolor. Aspectul clinic al leziunilor şi frotiu colorat Gram realizat din raclajul acestor leziuni, care evidenţiază hife scurte şi celule sferice caracteristice pentru *Malassezia furfur* (Ahmed, 2009; http://missinglink.ucsf.edu/lm/DermatologyGlossary/tinea_versicolor.html).

Infecţia se tratează cu soluţii keratolitice, cu acid salicilic sau cu compuşi azolici.

Tinea nigra (fig. 467) este o infecţie a stratului cornos al tegumentului, produsă de *Hortaea werneckii*, din grupul fungilor producători de melanină cu localizare parietală, ce conferă culoarea brună până la închisă, leziunilor tegumentare (Reid, 1998).

Examenul microscopic al raclajului tegumentar de la periferia leziunii relevă hife septate ramificate şi celule de levură în stadiul de înmugurire, cu perete melanizat.

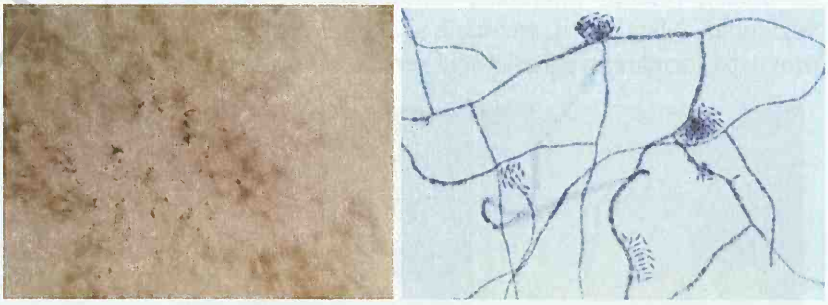


Fig. 467. Tinea nigra. În stânga, aspectul clinic al leziunilor. În dreapta, preparatul colorat cu albastru de brom timol din raclajul acestor leziuni ce evidenţiază hife lungi septate. Celulele levurice alungite, elipsoidale sunt denumite *Hortaea werneckii* (Xavier şi colab., 2008; http://phil.cdc.gov/ Public Health Image Library (PHIL)] -- image #3935).

Infecţia se tratează cu soluţie de sulfură de seleniu, aplicată zilnic. Compuşii azolici administraţi local sau oral sunt de asemenea eficienţi.

Trichophyton verrucosum produce *tinea* la vite, dar s-au raportat cazuri de infecţii produse la măgar, câine, capră, ovine şi cal. În anotimpul rece, când animalele sunt închise, incidenţa infecţiilor cu *Trichophyton verrucosum* creşte atât la om, cât şi la animale. Crescătorii de vite şi veterinarii suferă ocazional de tinea, produsă de *T. verrucosum.* Membrii complexului *T. mentagrophytes* (excepţie *T. mentagrophytes var. interdigitale*) sunt transmişi de rozătoare, iar incidenţa infecţiilor produse de

acest fung este mai mare în zonele rurale, în America de Nord şi Europa. *T. mentagrophytes* a fost izolat ocazional şi din sol, unde poate supravieţui până la câteva luni. Unii micologi consideră că *Microsporum persicolor* şi *T. simii* sunt specii geofile, în timp ce alţi autori le consideră ca fiind zoofile. Ambele specii au fost izolate în mod repetat din sol şi din firele de păr ale unor animale aparent sănătoase, purtătoare ale acestor fungi.

Infecţiile cutanate se tratează cu griseofulvină, itraconazol, miconazol, clotrimazol sau cu alţi agenţi antifungici cu aplicaţie locală.

Procesul infecţios în dermatomicoze este unic, având două caracteristici:

– ţesuturile vii nu sunt invadate, fiind colonizat numai stratul cornos keratinizat. Prezenţa fungului şi a produşilor metabolici induce o reacţie alergică şi inflamatorie a gazdei. Severitatea şi tipul răspunsului gazdei este legată adesea de specia şi tulpina de dermatomicete care a produs infecţia;

– dermatomicetele sunt singurii fungi care au căpătat dependenţă de infecţia gazdelor umane şi animale pentru supravieţuirea şi diseminarea speciei.

Factorii de virulenţă sunt reprezentaţi de proteinaze, keratinaze, elastaze. Activarea imunităţii mediate celular, corelată cu hipersensibilitatea întârziată şi cu răspunsul inflamator, au ca finalitate vindecarea clinică, în timp ce lipsa imunităţii celulare sau deficienţa imunităţii mediată celular predispune gazda la o *dermatomicoză cronică* sau *recurentă.* O asemenea infecţie este cunoscută sub denumirea de *tinea* sau *impetigo*, bube dulci, pecingine (ringworm). Infecţia unghiilor se numeşte *onicomicoză.* Dermatomicetele, în mod normal, nu invadează ţesuturile vii, dar colonizează alte straturi ale pielii. Ocazional invadează ţesuturile subcutanate, dezvoltând kerion.

Dermatomicetele cutanate secretă *trichofitina*, un amestec de proteine, care determină o stare de sensibilizare a gazdei şi pacientul devine hipersensibil. Preparatul brut de trichofitină, obţinut prin filtrarea mediului în care a crescut *Trichophyton,* poate fi administrat intradermic pentru detectarea reacţiei de hipersensibilitate imediată sau întârziată, care însoţeşte dermatomicoza, la unii dintre pacienţi. Cei cu infecţii cronice neinflamatorii au reacţie de hipersensibilitate întârziată şi imunitate mediată celular, de mică intensitate. Aceşti pacienţi sunt atopici, au manifestări de hipersensibilitate imediată şi nivel crescut de IgE. Dermatomicetele originare în sol (geofile) şi cele zoofile induc reacţii inflamatorii mai intense şi sunt mai iritante. Dermatomicetele geofile localizate în firul de păr stimulează o reacţie inflamatorie mai intensă, asemănătoare celei piogenice.

Majoritatea fungilor patogeni nu produc toxine, dar în schimb prezintă modificări fiziologice în timpul infecţiei – creşterea ratei metabolice, modificarea căilor metabolice şi modificarea structurii peretelui celular. Mulţi dintre fungii patogeni sunt termotoleranţi şi pot rezista sistemelor microbicide fagocitare. Fungii sunt capabili să reziste mecanismelor de apărare a gazdelor.

Speciile de dermatomicete aparţinând celor trei genuri (*Epidermophyton, Microsporum* şi *Trichophyton*) prezintă patogenitate diferită *in vivo.* Toate speciile celor 3 genuri invadează stratul cornos al epidermei şi foliculul pilos, dar diferă în ceea ce priveşte capacitatea lor de a invada părul şi unghiile. Specificitatea de ţesut poate fi legată de necesităţile nutriţionale sau de producerea de diferite enzime.

Studiile *in vitro* demonstrează faptul că anumite tulpini de *Microsporum* şi *Trichophyton* produc enzime capabile să solubilizeze keratina şi proteinele fibroase înrudite din piele, păr, gheare, copite. Keratina, elastina şi colagenul reprezintă mai mult de 25% din greutatea organismului mamiferelor. Enzimele proteolitice sintetizate de către fungi măresc capacitatea de supravieţuire în ţesuturi alterând micromediul prin digestia proteinelor gazdei, furnizând astfel resursele nutritive; variaţiile potenţialului enzimatic sunt responsabile de diferenţele potenţialului patogen al diferitelor tulpini.

Infecţiile cu dermatomicete sunt dobândite prin contactul tegumentului lezat, cu solul sau cu organismele infectate (animale şi om). Speciile geofile sunt transmise prin contact cu solul. Speciile zoofile sunt transmise de către animalul infectat, iar fungii antropofili sunt transmişi direct prin contactul tegumentar cu gazda infectată sau indirect cu pielea exfoliată infectată, părul din perii, haine sau cu obiecte contaminate. S-a remarcat existenţa unor purtători asimptomatici. Sunt infectate atât gazdele sănătoase, cât şi pacienţii imunocompromişi. Sensibilitatea gazdei la infecţie creşte în condiţii de umiditate, căldură, factori chimici specifici ai tegumentului (compoziţia sebumului şi perspiraţia), vârsta tânără, predispoziţia genetică şi când există o rană la nivelul pielii (cicatrici, arsuri). În funcţie de specie, aceste microorganisme pot supravieţui în mediu mai mult de 15 luni.

Vârsta este un factor important care condiționează sensibilitatea la infecție: *impetigo* al pielii capului este frecventă la copii şi rară la adulți, iar *infecția interdigitală* este frecventă la adulți şi rară la copii. Acizii graşi nesaturați din secreția glandelor sebacee ale adultului au acțiune antifungică, ceea ce explică rezistența mai mare la infecțiile fungice superficiale. Una dintre substanțele antifungice din secreția glandelor sebacee, *acidul undecilenic*, se adaugă în compoziția multor unguente, folosite în controlul infecțiilor fungice ale pielii. Infecția interdigitală este favorizată de umiditatea locală crescută şi este produsă de fungi din g. *Epidermophyton.*

28.3.1.2. Micozele subcutanate sunt produse de fungi al căror habitat este solul sau vegetația. Fungii infectează leziunile tegumentare sau sunt inoculate cu materialul contaminat prin traumatisme. Infecția țesutului conjunctiv dermic evoluează ca o leziune granulomatoasă şi, din zona inițială, se extinde lent. Rareori, infecția subcutanată evoluează sistemic, pe fondul imunodepresiei.

Infecțiile sunt produse de *Sporothrix schenckii* (fig. 468), un fung dimorfic, în funcție de temperatura de creştere: la temperatura ambientală creşterea este filamentoasă, cu hife ramificate, septate şi conidii, iar în țesuturi şi la 35–37° creşte ca levură care înmugureşte. Sporotrichoza este o infecție granulomatoasă cronică, care afectează țesuturile cutanate, subcutanate şi limfatice adiacente, caracterizată prin apariția unor leziuni nodulare, supurative şi ulcerative.

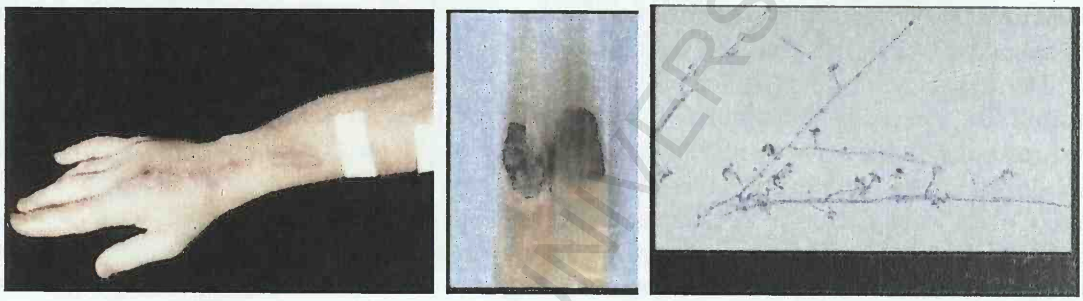


Fig. 468. Sporothrix schenckii. Aspectul leziunilor, morfologia coloniilor şi aspectul microscopic, cu hife lungi, ramificate şi conidii sferice, formate pe conidiofori lungi (Takashi MOCHIZUKI – Pathogenic Fungi Database(PFDB), http://timm.main.teikyo-u.ac.jp/pfdb/).

Micetoma este o infecție cronică granulomatoasă, indusă de inocularea traumatică a câtorva specii saprobionte de fungi sau de bacterii actinomicete. Actinomicetele g. *Madura* din sol produc *actinomicetomul*. Micetomul produs de fungi este un *eumicetom*. Actinomicetomul este mai invaziv şi se extinde din țesutul subcutanat de la locul infecției, spre țesutul muscular subiacent. Fungii care produc micetoma sunt specii ale genului *Madurella* (fig. 469), ce formează colonii caracteristice, ce produc un pigment brun difuzibil în mediu, iar la microscop se evidențiază fialidiile ce poartă conidii sferice sau conidiofori cu conidii piriforme (Chung şi Benett, 2002).

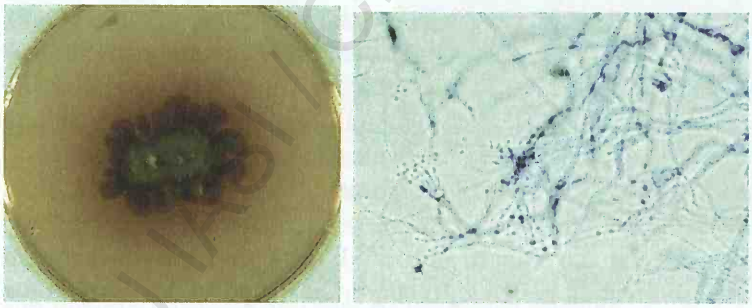


Fig. 469. Madurella mycetomatis. Morfologia coloniilor şi aspectul microscopic, cu fialidii ce poartă conidii sferice (Mycology online, www.mycology.adelaide.edu.au).

Alte specii care cauzează dermatoficoze sunt: *Nattrassia mangiferae* (agent al onicomicozelor şi infecțiilor cutanate superficiale, mai ales în zonele tropicale).

Hifomicetele sunt fungi filamentoşi care produc colonii maron închis, verde închis sau negre şi sunt agenți ai feohifomicozelor.

Alternaria (fig. 470), *Bipolaris, Exserohilum* produc infecţii cutanate (keratite micotice), feohifomicoze (infecţii subcutanate, sinuzită paranazală, osteomielită şi peritonită la pacienţi dializaţi).

Fig. 470. Alternaria. Cultură dezvoltată pe mediu lactozat (stg.) şi frotiu amprentă (Foto Elvira Borcan).

Cladophialophora bantiana produce abcese cerebrale şi infecţii subcutanate la pacienţi imundeprimaţi, iar *Cladophialophora carrionii* şi *Fonsecaea* produc cromoblastomicoza.

Curvularia lunata, C. pallescens şi *C. geniculata* produc sinuzite, endocardite, peritonite şi infecţii diseminate (McGinnis, 1980).

Exophiala jeanselmei, E. moniliae şi *E.spinifera* produc micetoame, infecţii localizate subcutanate, cutanate, endocardite, infecţii cerebrale şi sistemice (De Hoog şi Hermanides-Nijhof, 1977).

Scedosporium poate produce infecţii neinvazive ale urechii externe şi pulmonare sau invazive, posttraumatice, artrite, osteomielite, keratite micotice, sinuzite, meningite, abcese cerebrale, endoftalmite, la pacienţii imunodeprimaţi.

28.3.2. Micozele sistemice primare sunt produse de speciile a 4 genuri de fungi: *Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Paracoccidioides brasiliensis, Blastomyces dermatitidis.* Distribuţia este restrânsă la ariile endemice specifice. Distribuţia este restrânsă la ariile endemice specifice. Creşterea lor este dimorfică, dependentă de temperatură. *Coccidioides* şi *Histoplasma* sunt organisme rezidente în sol, iar pentru *Paracoccidioides* şi *Blastomyces*, habitatul nu este cunoscut.

Infecţiile sunt iniţiate în ţesutul pulmonar, după germinarea conidiilor inhalate. Marea majoritate a infecţiilor sunt subclinice, deoarece macrofagele alveolare fagocitează şi distrug agentul infecţios. Puţine infecţii evoluează clinic, la nivel pulmonar. Dintre acestea, rareori procesul infecţios patologic se extinde la alte organe. Cu rare excepţii, aceste infecţii micotice nu se transmit la alţi indivizi.

Procesul infecţios evoluează cu inflamaţie *granulomatoasă*, datorită persistenţei agentului patogen în macrofagele alveolare. Se sintetizează anticorpi şi se activează IMC. La persoanele imunocompetente, răspunsul IMC elimină reacţia inflamatorie, dar agentul infecţios persistă în stare latentă în macrofage şi reprezintă forma latentă a infecţiei cu potenţial de recurenţă. Persoanele imunocompromise prezintă un risc crescut de infecţie gravă.

H. capsulatum (denumirea vine de la faptul că pe preparatele colorate Giemsa şi Gram, peretele celular de *H. capsulatum* este impermeabil pentru coloranţi, celulele de levură pe secţiunile ţesutului infectat, aparând adeseori ca fiind înconjurate de un spaţiu incolor, interpretat incorect ca fiind o structură capsulară), un fung saprobiont din sol, dimorfic, produce *histoplasmoza*, cea mai frecventă infecţie micotică la om şi la animale. Stadiul sexuat se numeşte *Emmonsiella capsulata.* În sol este favorizată de substratul azotat alcalin de guano şi creşte sub formă filamentoasă, cu formarea de macro- şi microconidii. La temperatura corpului (37°C) se dezvoltă forma levurică.

Histoplasmoza este o infecţie iniţiată prin inhalarea conidiilor şi apare la indivizii umani în toate zonele geografice. Procesul infecţios stimulează sinteza anticorpilor şi răspunsul IMC. După infecţie, chiar asimptomatică, organismul gazdă se sensibilizează la *histoplasmină*, un amestec de polipeptide pe care *Histoplasma* le eliberează în mediul de creştere. Histoplasmina se obţine în formă brută, din filtratul culturii în mediul lichid.

Conidiile inhalate cresc sub formă de levură şi sunt fagocitate de macrofagele alveolare, în interiorul cărora se pot multiplica. Localizată în macrofage, *Histoplasma* se poate disemina în ficat, splină, ganglioni limfatici, unde reacţia inflamatorie iniţială devine *granulomatoasă* după activarea răspunsului IMC. Interleukinele secretate de limfocite activează macrofagele, care devin inhibitorii pentru creşterea intracelulară a levurilor (Griffith, 1995). Cea mai importantă caracteristică de virulenţă este capacitatea parazitului de a parazita macrofagele. Histoplasma se multiplică în interiorul fagosomului, cu o rată comparabilă cu cea din mediul de creştere în mediul lichid. Macrofagele

constituie un mediu optim de creştere şi de multiplicare, dar şi de diseminare a parazitului. Neutrofilele sunt, alături de macrofage, o nişă favorabilă creşterii *H. capsulatum*. Fagocitele parazitate eliberează molecule toxice: O_2^- (superoxid), H_2O_2, $^1O_2$, OH^-, dar parazitul neutralizează efectul moleculelor toxice prin sinteza catalazei. Se pare că lizosomii fuzionează cu vezicula de fagocitoză, dar parazitul modulează valoarea pH a fagosomului, menţinându-l la valoarea neutră, prin eliberarea NH_4^+, ca şi *M. tuberculosis* (Eisenberg şi colab., 1991). *H. capsulatum* pătrunde şi se multiplică în fagocitele neprofesioniste.

La indivizii imunocompetenţi, inhalarea agentului patogen într-o doză mare, declanşează histoplasmoza acută, o infecţie autolimitată, cu febră, frisoane, mialgie, dureri de cap, tuse uscată. Infecţia se cronicizează în special la bărbaţi şi devine latentă. Episoadele periodice se datorează reactivării focarelor de infecţie latentă. Histoplasmoza severă diseminată evoluează la un număr mic dintre cei infectaţi: la copii, la vârstnici, la imunosupresaţi sau la imunodeficienţi (pacienţii SIDA).

În timpul progresiei histoplasmozei pulmonare, titrul anticorpilor creşte şi scade în perioada de latenţă. Anticorpii se detectează prin metoda imunodifuziei.

Testul tegumentar la histoplasmină, pentru detectarea reacţiei de hipersensibilitate întârziată devine pozitiv curând după infecţie şi rămâne pozitiv pentru mai mulţi ani.

Epidemiile de histoplasmoză apar, surprinzător, în ariile în care histoplasmoza este endemică şi majoritatea indivizilor au IMC demonstrabiă la testul histoplasminei. Totuşi, unii inivizi, la infecţia secundară fac histoplasmoză în forma clinică gravă. Paradoxul este explicat prin numărul mare de conidii care invadează ţesutul pulmonar, dar este posibil ca infecţia secundară să fie iniţiată de variante antigenice distincte, faţă de care organismul nu are memorie imunitară. Se crede că în ariile endemice, particularităţile solului ar induce apariţia unor variante modificate genetic sau antigenic (Groppe şi colab., 1991).

Tranziţia morfologică de la stadiul micelian saprobiont (în sol), la faza de levură (parazită) este prima treaptă a patogenezei. *In vitro*, conversia este un proces de durată şi dependent de cultivarea la temperatura de creştere la 37°, dar *in vivo*, în prezenţa macrofagelor, procesul este relativ rapid, în 24–72 de ore. Trecerea de la morfologia hifală miceliană la cea de levură este obligatorie pentru patogeneză şi progresia la histoplasmoză. Tulpinile tratate *in vitro* cu acid p-cloromercuri-fenil-sulfonic nu produc histoplasmoză, ceea ce sugerează că tranziţia la morfologia de levură este dependentă şi de alţi factori, nu numai de cel termic.

Un alt factor cu rol major în tranziţia morfologică este cisteina, un factor nutritiv esenţial al fazei de levură.

Diagnosticul de laborator al histoplasmozei presupune analiza mai multor probe: spută, urină, raclajul leziunilor superficiale, aspiratul de măduvă osoasă, leucocite sanguine. Pe frotiurile colorate prin metode speciale (Gomori) sau Giemsa, în citoplasma macrofagelor se observă celule ovoide, mici, de levură (fig. 471, 472).

Fig. 471. Mcroconidii de *H. capsulatum* (http://phil.cdc.gov/phil_images/20030624/4/PHIL_4023_lores.jpg).

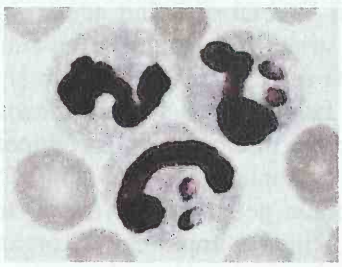


Fig. 472. Celule levurice de *Histoplasma capsulatum* în citoplasma neutrofilelor de câine (frotiu de sânge, colorație Wright-Leishman) (Edison şi colab., 2003).

H. capsulatum creşte pe medii complexe (glucoză, cisteină, sânge, agar) la 37° şi pe Sabouraud agarizat la 25–30°, după o incubaţie de 4 săptămâni (fig. 473).

Infecţiile uşoare se tratează cu itraconazol, iar histoplasmoza diseminată, cu amfotericină B.

Fig. 473. Aspectul coloniilor de *Histoplasma capsulatum* pe mediu Sabouraud agarizat.

Fig. 474. Forma filamentoasă de *Blastomyces dermatitidis* (Tom Volk T, 2001).

Blastomyces dermatitidis este un fung cu creştere dimorfică, în funcţie de temperatură: la 25° creşterea este filamentoasă cu hife septate, ramificate şi cu conidii, iar la 37°, atât *in vivo* cât şi *in vitro* creşte sub formă de levură, cu celule mari, izolate, care înmuguresc (fig. 474).

Infecţia cu *B. dermatitidis* este iniţiată în plămâni, după inhalarea conidiilor. Probabil că marea majoritate a infecţiilor sunt subclinice. Infecţiile medii, cu infiltrat pulmonar, sunt supurative şi autolimitate. Din localizarea pulmonară, infecţia se poate disemina în oricare organ, dar mai frecvent în tegument şi în ţesutul osos. După diseminare, apar leziuni tegumentare supurative. Factorul de virulenţă pare a fi un fosfolipid legat covalent de glucan.

În mediul de creştere, *B. dermatitidis* eliberează un amestec de antigene, denumite *blastomicină*, lipsit de specificitate în testul tegumentar sau serologic.

B. dermatitidis produce infecţii, cu cea mai mare frecvenţă, la câine şi rareori infectează alte specii în ariile endemice. Infecţia nu este transmisă de animalele sau de persoanele infectate.
La om produce boala cronică granulomatoasă (CGD*). Netratată, infecţia are aproape totdeauna un sfârşit letal. Agentul terapeutic cu acţiune optimă este amfotericina B.

* CGD (boala cronică granulomatoasă) este datorată mutaţiei unei gene lincată pe cromosomul x, fiind cea mai cunoscută deficienţă a activităţii bactericide a neutrofilelor. Capacitatea de fagocitoză este normală, dar activitatea bactericidă faţă de agenţii care nu eliberează H_2O_2 (*S. aureus, Seratia marcescens*) este foarte mult diminuată. Fagocitele acestor pacienţi au un metabolism oxidativ deficitar, datorită unei defect al *oxidazei respiratorii,* ce constă în faptul că fagocitoza nu este urmată de intensificarea metabolismului oxidativ şi din această cauză nu se generează intermediarii reactivi ai reducerii O_2.

Efectul bactericid se menţine faţă de bacteriile care produc H_2O_2 (streptococi, lactobacili). La pacienţii CGD creşte incidenţa infecţiilor cu bacterii aerobe catalazo-pozitive, care inactivează H_2O_2 rezultată din propria lor activitate metabolică. Infecţiile cu bacterii, levuri (*Candida*), fungi filamentoşi (*Aspergillus*) sunt trenante şi însoţite de reacţii inflamatorii ample, care evoluează în granuloame, ca o reflectare a incapacităţii de a inactiva chemoatractanţii şi de a degrada antigenul. Deficienţa enzimatică esenţială este oxidaza care transferă electronii de la NADPH la O_2, pentru a forma anionul O_2^-.

Coccidioides immitis (fig. 475) este agentul coccidioidomicozei, o infecţie pulmonară, cauzată de inhalarea conidiilor. Dimensiunile mici ale sporilor de *C. neoformans* favorizează depunerea lor în alveolele pulmonare. Infecţia este iniţiată după inhalarea prafului contaminat cu artrospori. Sporii sunt fagocitaţi de macrofagele alveolare şi rezultă coccidioidomicoza primară, cu evoluţie variabilă, de la infecţia inaparentă până la pneumonia severă. Endosporii pot ajunge în circulaţia sistemică şi ulterior în diferite situsuri din organism (oase, articulaţii, ţesutul cutanat şi subcutanat), inclusiv în SNC, unde poate produce leziuni grave, cu formarea de abcese.

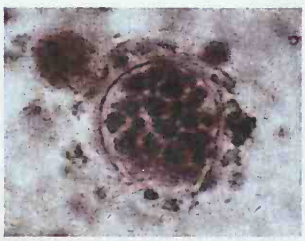


Fig. 475. Forma miceliană de *Coccidioides immitis,* cu conidii rectangulare formate din celule hifale, prin creşterea turgescenţei şi a rigidităţii peretelui celular (stânga) şi forma levurică, cu sferule ce conţin endospori, asemănătoare cu protozoarul *Coccidia,* vezi *Cococcidiodes* – asemănător cu *Coccidia* (dr.) (Volk, 2002).

Uneori pot apărea reacții alergice cutanate. Prezintă fenomenul de variație antigenică, prin care eludează mecanismele de apărare a gazdei. Pe frotiurile din țesutul infectat se observă structuri sferice (sferule), cu diametru de 15–60 µm, perete gros, pline cu peste 100 de endospori sferici, până la ovoizi.

Circa 5% din infecțiile severe evoluează sub forma plămânului cavernos cronic. Mai puțin de 1% din totalul infecțiilor pulmonare severe se disemineză pe cale hematogenă și inițiază formarea focarelor inflamatorii granulomatoase în tegument, oase, articulații, meninge.

Unul dintre factorii de virulență este *elastaza* (proteaza extracelulară). Fracția solubilă a peretelui conidial conține enzime cu rol de factori de virulență

Coccidioides este considerat fungul cu cea mai mare virulență, riscul mărit de infecție fiind asociat cu profesiile expuse la inhalarea prafului de sol (agricultori, arheologi, constructori). Se presupune că rasa neagră este mai sensibilă la infecție. Contaminarea solului este maximă în sezonul umed, în timp ce în sezonul uscat fungul supraviețuieşte la adâncimea de 20 cm. Nu se cultivă în laborator datorită infecțiozității ridicate și faptului că artrosporii trec prin filtrele de 2 mm ale hotelor normale de laborator. Studii recente la nivel molecular au demonstrat existența a două specii: *Coccidioides immitis*, prezentă doar în California, şi *Coccidioides posadasii*, după numele lui Alejandro Posadas, descoperitorul maladiei, izolată din alte regiuni ale globului (Fisher şi colab., 2002).

Diagnosticul este foarte dificil şi constă în evidențierea sferulelor pe frotiuri realizate din țesuturile ce prezintă leziuni. Coccidiomicoza sistemică se tratează cu amfotericină B sau cu azoli (ketoconazol sau itraconazol).

Blastomyces brasiliensis (Paracoccidioides brasiliensis) (fig. 476) este un fung dimorf, cu creştere filammentoasă la temepratura camerei şi levurică la temperatura corpului. Conidiile sunt abundente şi se formează la extremitatea conidioforilor.

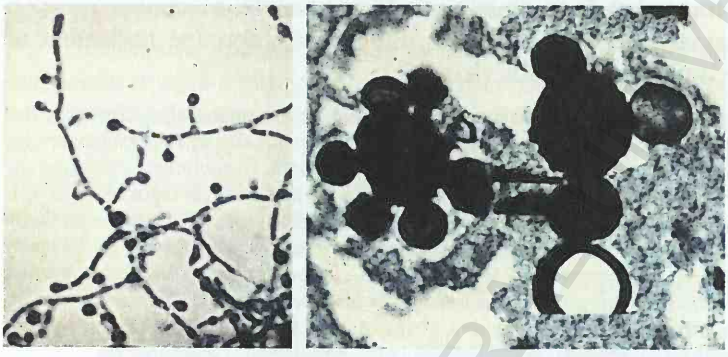


Fig. 476. Forma miceliană de *Paracoccidioides brasiliensis,* cu conidii formate la extremitatea hifelor (stânga) şi forma levurică, cu înmugurire multiplă (dreapta) (Volk şi Mossman, 2005).

Miceliul se dezvoltă lent pe mediul de cultură, după 20–30 de zile de incubare la temperatura camerei, formând colonii de culori şi forme variate. Forma levurică apare după 5–10 zile de incubare la 37°C, iar la microscop se evidențiază înmugurirea multiplă a unei celule levurice, caracter diferențial pentru această specie.

Paracoccidioidomicoza este o boală cronică, granulomatoasă, progresivă localizată la nivelul plămânilor, mucoasei oronazale, cu afectare ganglionară, a suprarenalelor şi a altor viscere. Infecția se transmite prin inhalarea aerosolilor contaminați sau prin implantarea traumatică a sporilor în organism.

Infecțiile cu *B. brasiliensis* se tratează cu derivați azolici (itraconazol), cu amfotericină B, cu sulfonamide.

28.3.3. Micoze oportuniste

Micozele oportuniste sunt produse de fungii ubicvitari în mediul extern sau componenți ai microbiotei normale, numai la persoanele imuno-compromise, dar persoanele normo-reactive sunt rezistente.

Candida şi levurile înrudite sunt oportuniste endogene, dar alte micoze oportuniste sunt produse de fungi exogeni din sol, apă sau din aer.

Genul *Candida* cuprinde circa de 150 de specii de levuri ascosporogene, cu distribuție ubiquitară, cu specii saprobionte sau componente ale microbiotei normale a tractului digestiv, a tegumentelor şi a mucoaselor la om. Colonizarea este timpurie, curând după naştere.

Dimorfismul speciei suscită un interes deosebit, deoarece formarea hifelor este considerată a fi un proces cu semnificație patologică, componentele de suprafață exprimate diferit la cele două forme, modulând aderența, invazia și consecutiv, relația gazdă-parazit. Diferențele în exprimarea antigenelor de suprafață, care se produc concomitent cu modificările morfologice la nivelul peretelui celular, au un efect de potențare a proprietăților de aderență la substrat și implicit a virulenței.

Micoza se localizează, în primul rând, la nivelul membranelor mucoase, dar și în piele sau plămân. Micozele mucoasei bucale a nou-născutului sunt comune, iar la adult, *Candida* produce procese patologice bucale, tonsilare și vaginale. Candidoza este o infecție a persoanelor imunocompromise.

În candidoze se pot observa celule levuriforme, pseudomicelii și tuburi germinative, greu de diferențiat de filamentele miceliene ale microfungilor dermatofite. În spută sau în abcesele subcutanate se pot evidenția elemente levuriforme (fig. 477). Aderența la substratul celular poate fi urmată de invazie hifală și pseudohifală cu tulpini virulente de *C. albicans*, în timp ce colonizarea cu specii mai puțin virulente poate fi limitată la straturile cheratinizate.

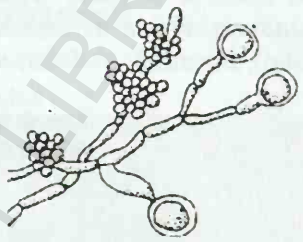


Fig. 477. Reprezentarea schematică a corpilor de fructificație la *C. albicans*.

Virulența și patogenitatea tulpinilor de *C. albicans* este condiționată de capacitatea acestora de a *adera* la suprafața celulelor gazdă, de a produce factori de virulență solubili implicați în progresia infecției (fosfolipaze, proteaze) și de proprietatea de *înmugurire* (formarea hifelor reprezintă un mecanism de evitare a mecanismelor de apărare a gazdei).

Colonizarea intestinului (organ important prin efectul său de barieră anti-infecțioasă exercitat de microbiota intestinală autohtonă) cu microorganisme exogene nu determină simptomele procesului infecțios, mai ales la gazdele imunocompetente (Andremont, 1992). Totuși, unele dintre microorganismele exogene sunt potențial patogene, în special pentru gazdele imunocompromise. Pentru a preveni colonizarea cu microorganisme exogene, o barieră eficientă trebuie să mențină populațiile de microorganisme endogene ale microbiotei normale la densități mici (barieră permisivă), mai ales a acelora care, deși totdeauna prezente în microbiota normală a subiecților sănătoși, pot deveni patogene dacă numărul lor crește excesiv. Un astfel de patogen oportunist este și *C. albicans*.

Efectul de barieră poate fi influențat de diferiți factori: dieta, stresul psihic, dar în special de tratamentele cu antibiotice cu spectru larg, care determină multiplicarea excesivă a microorganismelor rezistente și emergența celor potențial patogene. De la o stare de *eubioză* se ajunge la o stare de *disbioză* (Andremont, 1992). Pentru ca microbiota intestinală să-și exercite funcția de barieră este esențială păstrarea diversității, dar un tratament cu antibiotice, deși nu elimină complet microbiota, o simplifică și astfel, specii așa cum este *Candida,* a căror creștere în condiții obișnuite este supresată, devin capabile de colonizare.

Candida și levurile înrudite sunt oportuniste endogene, care produc infecții la persoanele imunocompromise, dar alte micoze oportuniste sunt produse de fungi exogeni din sol, apă, plante sau din aer, care invadează tractul respirator. Cele mai importante micoze oportuniste, în afară de candidoză, sunt aspergiloza, criptococoza, mucormicoza. Toate micozele oportuniste au un focar primar de infecție, de regulă în tractul respirator superior sau inferior. De aici, agentul patogen se diseminează pe cale sanguină sau limfatică, în alte organe.

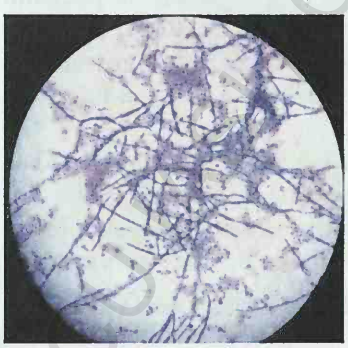


Fig. 478. Micelii și celule levurice – frotiu din spută, colorație Gram (foto Elvira Borcan).

Candidoza este cea mai comună micoză sistemică, produsă de mai multe specii de *Candida* (*C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata* etc.). *C. albicans* este agentul patogen din grupul *fungilor imperfecti,* izolat cu cea mai mare frecvență din probele clinice (70% din totalul infecțiilor produse de *Candida*). Este agentul etiologic comun al infecțiilor severe ale mucoaselor, pielii și unghiilor. Spre deosebire de celelalte specii, *C. albicans* este dimorfică: produce nu numai pseudohife caracteristice levurilor, dar și hife adevărate. Pe mediul agarizat, pseudohifele cresc submers, în grosimea agarului.

C. albicans se distinge de alte specii de *Candida* prin teste morfologice: după incubarea în ser pentru circa 90 de minute, la 37°,

celulele de *C. albicans* încep să formeze hife adevărate cu tuburi de germinare, iar pe mediul cu deficit nutriţional produce spori mari sferici.

Candidoza superficială (cutanată şi a mucoaselor) este rezultatul creşterii numerice a celulelor de levură şi se exprimă prin leziuni ale tegumentului şi respectiv ale mucoaselor, ce permit invazia locală a levurii şi pseudohifelor.

După ce invadează torentul sanguin, dacă apărarea fagocitară a gazdei este inadecvată pentru a stopa creşterea levurii, infecţia cu *Candida* devine sistemică (fig. 479). Din torentul sanguin, *C. albicans* poate infecta rinichiul, se fixează pe valvele protetice ale inimii, infectează articulaţiile sau meningele.

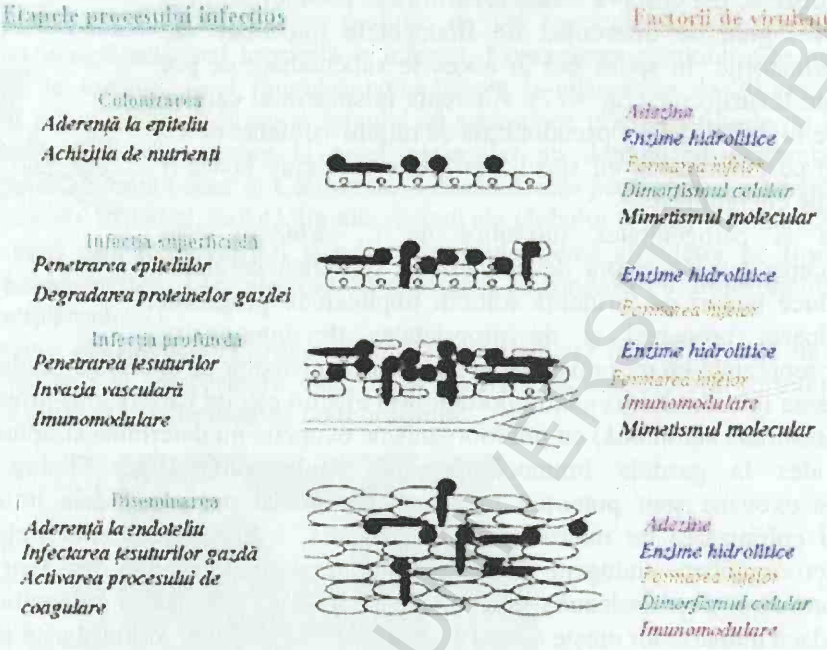


Fig. 479. Etapele procesului infecţios cu *Candida* şi factorii de virulenţă implicaţi în acest proces (după Naglik, 2003).

Pe secţiunile histologice, în ţesutul infectat se observă infiltratul leucocitar inflamator, cu formarea abcesului piogenic, iar în formele grave, granuloame cronice. Leziunile conţin un număr mare de celule levuriforme, care înmuguresc, cu formarea pseudohifelor.

Creşterea numărului celulelor de *Candida* în lumenul intestinal este consecinţa administrării antibioticelor orale. Din lumen, *Candida* poate să treacă în sânge.

Candidoza superficială apare la pacienţii SIDA, în timpul sarcinii, la diabetici, la copii, la vârstnici, la cei cu imunodeficienţă celulară sau la cei trataţi cu corticosteroizi şi la pacienţii CGD.

Creşterea agentului patogen pe mucoasa limbii, pe epiteliul gingival şi al palatului formează o pseudomembrană alburie zonală sau chiar confluentă, alcătuită din celule epiteliale, levuri şi pseudohife.

Candidozele orofaringiene sunt manifestări frecvente ale patologiei oportuniste la pacienţii SIDA, fiind prezente la 50% dintre indivizii seropozitivi şi la 90% dintre bolnavii de SIDA. Infecţiile oportuniste cu *Candida* sunt frecvente şi la alte categorii de pacienţi imunodeprimaţi, cum sunt cei leucemici şi cei cu neoplazie orofaringiană. Situsurile principale ale infecţiilor cu *Candida* sunt plămânul, epiteliul urinar şi tubul digestiv.

Invazia mucoasei vaginale produce *vulvo-vaginită*, cu iritaţie, prurit şi secreţie şi este precedată de diabet, ingestia medicamentelor antibacteriene ce alterează microbiota locală şi aciditatea locală.

Candidoza cutanată este consecinţa invaziei tegumentului traumatizat sau după arsuri. Infecţia axilară, inguinală, intergluteală şi inframamară, comună la diabetici şi la obezi, este favorizată de temperatură şi de umiditate. Ariile infectate devin eritematoase şi se pot forma vezicule.

Infecţia patului unghiei produce *onicomicoza*, cu edem dureros şi eritematos al unghiei, care poate să compromită vitalitatea ţesutului şi să distrugă unghia.

Candidoza sistemică este consecinţa introducerii cateterelor, intervenţiilor chirurgicale, abuzului de medicamente intravenoase, aspiraţiei medulare, leziunii tegumentare sau a mucoasei

tractului intestinal. La pacienții normo-reactivi, *Candida* este epurată din sânge. La persoanele cu deficit al funcției fagocitelor, la cele tratate cu corticosteroizi sau cu alți agenți imunosupresori, la cei cu boli ale sângelui (leucemii, limfom, anemie aplazică) sau cu CGD se dezvoltă leziuni în special în rinichi, inimă, meninge.

Diagnosticul. Probele de analiză sunt tampoane şi raclaje din leziunile superficiale, sângele, LCR, biopsii tisulare, urina, exudatul, probe din cateterele intravenoase.

Probele se examinează pe preparate proaspete lamă /lamelă (în soluție 20% KOH) sau pe frotiuri care se colorează Gram pentru prezența pseudohifelor şi a levurilor înmugurite sau May-Grünwald-Giemsa. Coloraţia Gram este însă neadecvată pentru detectarea celulelor levurice de dimensiuni mici (*Candida glabrata).* La examenul microscopic se urmăreşte cu atenție prezența, forma şi dimensiunile formațiunilor caracteristice levurilor: blastospori, pseudohife, filamente (hife) (fig. 480).

Fig. 480. Imagini sugestive pentru candidoza vaginală pe preparat proaspăt şi respectiv, colorat cu albastru de metilen. Se observă blastospori (x100, x 400).

Toate probele se pot cultiva pe medii pentru fungi sau pentru bacterii, la temperatura camerei sau la 37°, identificarea până la nivel de specie putându-se realiza prin teste de tip API (fig. 481–483). Coloniile de levuri se examinează pentru prezența pseudohifelor.

Fig. 481. Aspectul culturii de *C. albicans* pe geloză sânge (stânga) şi pe mediu Müller Hinton (mijloc, dreapta).

Fig. 482. Levuri. Colorație cu albastru de metilen (x 1000).

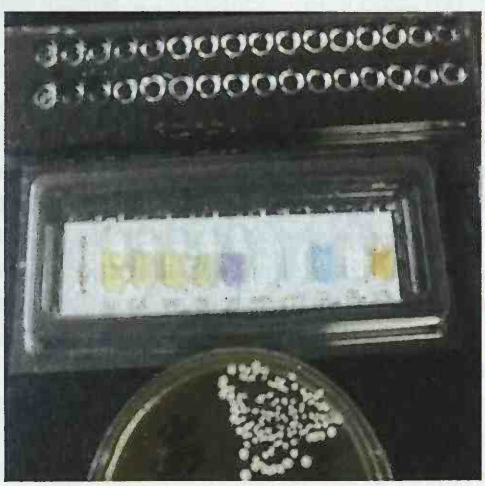


Fig. 483. Galerie Api pentru identificarea levurilor tip *Candida* (foto Elvira Borcan).

Culturile pozitive din situsuri sterile în mod normal au semnificație pentru diagnostic. Culturile pozitive din sânge denotă o candidoză sistemică sau o candidemie tranzitorie datorită contaminării normale. Culturile din spută nu au valoare de diagnostic, deoarece *Candida* face parte din microbiota normală. Cateterele contaminate pot da culturi fals pozitive ale urinii. Culturile din leziunile contaminate au valoare de diagnostic.

Infecția cu *Candida*, în special cea sistemică, stimulează sinteza anticorpilor şi IMC. Testul serologic nu se foloseşte pentru diagnosticul infecției.

Detectarea *mananului* parietal prin testul latex aglutinării sau testul EIA este mult mai specifică, dar are utilitate limitată, deoarece, candidemia este tranzitorie chiar în infecția sistemică sau titrul antigenic atinge valori semnificative şi detectabile numai în faza tardivă a infecției.

Rezistența la infecția cu *Candida* este conferită în primul rând de neutrofile, dar limfocitele TCD_4 sunt importante pentru controlul candidozei mucocutanate prin interleukinele stimulatoare ale IMH şi IMC.

Infecțiile mucocutanate se tratează cu nistatin aplicat local sau cu ketoconazol ori fluconazol, administrate oral. Infecția sistemică se tratează cu amfotericina B.

Infecția poate fi prevenită prin evitarea perturbării echilibrului microbiotei normale.

Cryptococcus neoformans este o levură din clasa bazidiomicetelor, prevăzută cu structură capsulară. După inhalarea bazidiosporilor sau a celulelor uscate, *C. neoformans* produce *criptococoza*.

Toate speciile de *Cryptococcus* sunt capsulate şi pozitive pentru testul ureazei. S-au identificat 5 serotipuri ale polizaharidului capsular (A, B, C, D şi AD), un polimer neramificat de manoză, cu legături alfa-1,3.

C. neoformans produce criptococoza, o infecție rară, dar incidența creşte foarte mult la persoanele cu deficit al IMC. Factorii majori de risc sunt imunodeficiența severă, limfopenia, terapia cu corticosteroizi, limfocitopenia idiopatică TCD_4.

Fig. 484. Cryptococcus neoformans pe frotiu colorat Gram, din LCR prelevat de la un pacient SIDA cu meningoencefalită (foto Elvira Borcan).

C. neoformans este o levură prevăzută cu o structură capsulară de natură polizaharidică, cu o grosime de câțiva µm. Este singurul agent patogen fungic capsulat, capsula fiind formată dintr-un polizaharid vâscos, unicul component fiind glucuroxilomananul. Celule individuale au 3–5 µm. Se cultivă pe agar Sabouraud, la 30–35°, cu o perioadă de incubație de 3–4 zile. Tulpinile capsulate (fig. 484) nu sunt fagocitate, deoarece suprafața capsulei este chimiotactic negativă pentru fagocite, iar cele necapsulate sunt mult mai puțin virulente. Capsula nu a evoluat ca un factor de virulență, ci ca factor de rezistență la condițiile nefavorabile. *C. neoformans* are o capsulă consistentă în țesuturile gazdei infectate, dar în prezența nutrienților şi a apei, sinteza capsulei este represată. În absența Fe, sinteza capsulei este stimulată.

Capsula activează calea alternativă a fixării complementului. C3b opsonizează celulele fungice şi uşurează ingestia de către fagocite. În infecția cu *C. neoformans*, activarea amplă a C de către polizaharidul capsular, duce la epuizarea C seric şi la pierderea capacității opsonizante. Serul conține Ac anti-glucuroxilomanan, dar nu au rol opsonizant. Polizaharidul capsular este slab imunogen şi induce starea de toleranță.

C. neoformans se deosebeşte de alte levuri prin proprietățile metabolice speciale: degradează ureea. Testul aglutinării particulelor de latex tapetate cu anticorpi anti-polizaharidul capsular se foloseşte pentru detectarea polizaharidului în LCR şi în ser.

C. neoformans se dezvoltă în excrementele de păsări, în special de porumbel, principalul rezervor de infecție, dar gazdele aviare nu sunt infectate.

Infecția este inițiată odată cu inhalarea aerosolilor contaminați cu bazidiospori sau cu celule uscate din mediul extern.

C. neoformans infectează, în primul rând, persoanele imunodeficitare (pacienții SIDA), pe cei cu malignități hematologice, dar şi persoane normoreactive şi produce *criptococoza*. Terapia steroidiană este alt factor predispozant.

Infecția este inițiată prin inhalarea aerosolilor din mediul extern contaminați cu levura uscată. Infecția primară pulmonară este de cele mai multe ori asimptomatică sau însoțită de simptome de tipul răcelii comune. Cele mai multe infecții pulmonare se vindecă spontan. La pacienții imunocompromiși, levura se multiplică în plămân, trece în torentul sanguin, se diseminează în SNC și produce meningoencefalita sau se localizează în tegument, în țesutul osos, prostată, globul ocular, glandele suprarenale.

Manifestarea clinică majoră este meningita cronică, cu abces cerebral și maladie degenerativă a SNC.

Probele de analiză pentru diagnostic sunt LCR, sputa, sângele, urina, țesuturile lezate. Probele se examinează în stare nativă sau după amestecul cu tuș de India pentru evidențierea capsulei.

Anticorpii din serul pacientului se detectează în reacția de fixare a complementului, prin reacția de precipitare în gel sau prin metoda latex-aglutinării. Testul tegumentar la *coccidioidină*, amestecul de polipeptide pe care agentul patogen le eliberează în mediul lichid, evaluează gradul de sensibilizare a organismului gazdă, la componentele fungice.

Agentul patogen nu se transmite de la gazdele infectate la persoanele sănătoase.

Forma diseminată a infecției se tratează cu amfotericină B.

Diagnosticul este foarte important în localizarea meningeală. Probele de analiză pentru diagnostic sunt LCR, sputa, sângele, urina, țesuturile lezate. Probele se examinează în stare nativă sau după amestecul cu tuș de India pentru evidențierea capsulei. Agentul patogen se detectează în sedimentul LCR, la microscopul cu contrast de fază.

Meningita criptococică se tratează cu amfotericina B în asociație cu 5- flucitozină.

Pneumocystis jiroveci (*Pn. carinii*) este agentul pneumoniei la persoanele imunocompromise. Inițial s-a crezut că este un protozoar, dar metodele de analiză moleculară au evidențiat afinitatea cu ascomicetele. Speciile de *Pneumocystis* se găsesc în plămânii multor specii de animale (șobolan, șoarece, câine, pisică, iepure, nevăstuică). *Pn. carinii* se găsește numai la șobolan (Brooks și col., 2007), iar specia izolată de la om este *Pn. jiroveci*, un patogen extracelular a cărui creștere este limitată la pelicula de lichid surfactant care acoperă epiteliul alveolar. Nu invadează parenchimul pulmonar.

Pneumocystis parcurge 3 stadii de dezvoltare. *Trofozoizii* sunt celule eliptice cu diametrul de 1,5–5 μm și se reproduc asexuat prin fisiune binară transversală. Doi trofozoizi haploizi de polaritate sexuală opusă fuzionează și inițiază ciclul de reproducere sexuată, formând un *sporozoid diploid*. În celula diploidă se succed 3 serii de diviziuni nucleare: prima este meiotică și rezultă 2 nuclei haploizi. Următoarele 2 diviziuni sunt mitotice și se formează 8 nuclei. Nucleii se compartimentează și rezultă 8 spori cu diametrul de 1–2 μm și rezultă al III-lea stadiu de dezvoltare – *chistul*. Peretele chistului se lizează și eliberează 8 spori din care se dezvoltă trofozoizii.

În sângele uman se găsesc anticorpi specifici. Se pare că infecția are loc timpuriu, în copilărie, iar *Pn. jiroveci* pare a fi componentă a microbiotei normale. IMC are rol determinant pentru rezistența la procesul infecțios. Simptomele clinice ale infecției apar numai la persoanele imunocompromise. Nu există rezervor natural al agentului infecțios, iar transmiterea probabil se face prin aerosoli.

Pneumocystis se multiplică în celulele epiteliale ale alveolelor pulmonare, pe care le lizează. Agentul patogen eliberat pătrunde în țesutul pulmonar și produce *pneumonia interstițială*. Din focarul pulmonar primar, agentul patogen se diseminează (1–2% din cazuri) în alte organe și produce infecții extrapulmonare (ale urechii medii, ochiului, SNC, ficatului, pancreasului etc.).

Agentul infecțios se evidențiază în lavajul bronhoalveolar, în biopsiile de țesut pulmonar, sau în spută pe preparate colorate Giemsa sau cu albastru de toluidină, unde se evidențiază chiști și trofozoizi.

Speciile de *Pneumocystis* nu se cultivă. Detectarea este ușurată de folosirea AMC specifici marcați cu fluorocromi (metoda IFD), față de un antigen al chistului.

Infecția acută se tratează cu cotrimoxazol (oral sau parenteral).

Alte specii de levuri izolate ocazional de la pacienți imunodeprimați: *Trichosporon beigelii/cutaneum* izolat din infecții fulminante la pacienți cu leucemie, transplantați, mielom multiplu, anemie aplastică, limfoame, tumori solide, SIDA, din peritonite la dializați, endoftalmite la pacienții operați de cataractă, endocardite asociate dispozitivelor protetice (Kreger – Van Rij, 1984); *Rhodotorula rubra* izolată din cazuri de peritonite, fungemii, endocardite, meningite la pacienți

dializaţi, cateterizaţi şi trataţi cu citostatice; *Malassezia furfur*, agent al pityriasis versicolor, dermatitei seboreice şi mătreţii (Guillot şi colab., 1996); *Loboa loboa*, necultivabilă, agent al lobomicozei, endemică în Brazilia, ce se manifestă prin apariţia de leziuni nodulare, keloidale, verucoide, cruste sau tumori; *Blastoschizomyces capitatis* produce infecţii diseminate la pacienţi neutropenici, leucemici sau transplantaţi, leziunile cutanate fiind similare celor din candidoza sistemică; *Saccharomyces cerevisiae,* produce ocazional fungemie, endocardită, peritonită la pacienţii SIDA, dializaţi, sau sub tratament cu citostatice.

Aspergiloza este cauzată de specii de *Aspergillus**, saprobionte ubicvitare în mediile naturale. Cel mai comun agent patogen pentru om este *A. fumigatus*, dar infecţiile pot fi produse şi de *A. flavus, A. niger, A. terreus*, deoarece conidiile trec cu uşurinţă în aerosoli.

* Denumirea de *Aspergillus* derivă din lb. Latină şi înseamnă "perie cu coadă", cu care seamănă condioforul cu lanţurile de conidii.

Maladiile umane produse de *Aspergillus* sunt de 3 tipuri: alergii, aspergilomul şi aspergiloza invazivă.

Alergia este consecinţa unei hiper-reactivităţi imunitare la indivizii atopici.

Aspergiloza este cauzată de specii de *Aspergillus*, saprobionte ubicvitare în mediile naturale. Cel mai comun agent patogen pentru om este *A. fumigatus*, dar infecţiile pot fi produse şi de *A. flavus, A. niger, A. terreus*, deoarece conidiile trec cu uşurinţă în aerosoli. Aspergiloza cu *A. fumigatus* este frecventă la puii de găină în primele zile după ecloziune, la care produce micoze de amploarea unei epidemii. Miceliul se dezvoltă abundent în plămân şi respiraţia devine imposibilă. Produce avortul la bovine, ovine etc. Omul prezintă rezistenţă naturală la infecţia cu *A. fumigatus*. Cazurile de îmbolnăvire sunt rare.

Poarta de intrare a sporilor este tractul respirator, dar *Aspergillus* poate să invadeze prin leziuni ale tegumentului sau prin mucoase.

După inhalarea conidiilor, persoanele atopice manifestă reacţii alergice severe faţă de antigenele conidiale. La persoanele imunocompromise, conidiile germinează în epiteliul tractului respirator şi invadează plămânii şi alte ţesuturi.

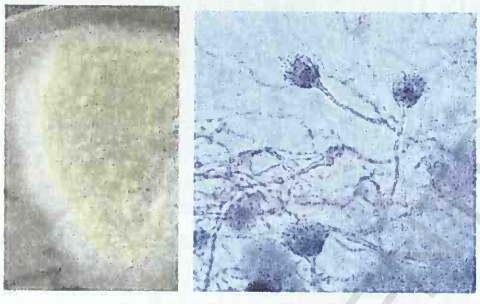


Fig. 485. Aspectul culturii de *Aspergillus niger* la 48 de ore, pe mediu Sabouraud (stânga) (foto Elvira Borcan). Aspectul microscopic al miceliului de *Aspergillus terreus* (dr.) (Porter, C.).

Aspergillus creşte pe o varietate de medii pentru fungi şi pentru bacterii. Coloniile sunt pudrate sau catifelate, adeseori cu un centru bombat. Hifele sunt septate, cu excepţia conidioforilor, care sunt neseptaţi. Conidioforii sunt lungi, cu o veziculă terminală de formă sferică, pe suprafaţa căreia sterigmele (fialidele) produc lanţuri de conidii (fig. 485). Speciile se identifică pe criteriul morfologic al acestor structuri: dimensiuni, textură, culoare.

Patogeneză. Organismul normoreactiv se apără de invazia fungică. Conidiile inhalate sunt fagocitate de macrofagele din alveolele pulmonare şi sunt digerate.

Patogeneza indusă de *Aspergillus* (*A. fumigatus, A. nidulans, A. niger, A. oryzae*) poate fi clasificată astfel:

- colonizare saprobiontă (aspergiloza bronho-pulmonară saprobiontă şi aspergilomul bronho-pulmonar);
- maladii alergice (astm, rinită, sinuzită alergică, pneumonie hipersensibilă (HP), aspergiloză bronho-pulmonară alergică (ABPA);
- infecţii sistemice (aspergiloza invazivă), la persoanele imunocompromise, la neutropenici, la cei trataţi cu doze mari de corticosteroizi, la pacienţii SIDA în stadiul final, dar rară la imunocompetenţi (Kumar şi colab., 1991).

Conidiile inhalate sunt fagocitate de macrofagele din alveolele pulmonare şi sunt digerate. La persoanele imunocompromise şi în condiţii experimentale, la animalele tratate cu corticosteroizi, capacitatea macrofagelor de a elimina agentul fungic invadator diminuează şi inoculul infecţios nu mai este anihilat. În plămân, conidiile germinează şi formează hife, care au tendinţa să invadeze alveolele şi vasele de sânge.

La persoanele atopice (cu predispoziție genetică), alergenele conidiale stimulează sinteza IgE şi induc reacția de *hipersensibilitate imediată* cu manifestare astmatică. La alți pacienți, hifele rezultate din germinarea conidiilor, colonizează epiteliul tractului respirator profund, dar nu invadează parenchimul pulmonar. În sputa pacienților se găsesc conidii de *Aspergillus,* în ser se detectează anticorpi specifici şi respirația devine greoaie.

Aspergilomul (micetomul, globulul fungic) este o altă varianta clinică a infecției *Aspergillus* şi se datorează germinării conidiilor şi formării hifelor abundente în spațiile aeriene ale plămânului, care iau aspecul unei sfere fungice. Riscul aspergilomului este mai mare la pacienții cu leziuni cavitare preexistente (cazeomul tuberculos). Pacienții prezintă toate simptomele infecției tuberculoase: tuse, oboseală, pierdere în greutate, hemoptizie, la care se adaugă dispneea, datorită creşterii hifelor în sacii alveolari. De obicei, aspergilomul este neinvaziv: infecții locale neinvazive (colonizări) se produc în sinusurile nazale, în urechea medie, în epiteliul corneean, în unghii.

Aspergiloza invazivă este un proces infecțios pulmonar acut, consecutiv inhalării şi germinării conidiilor. Pacienții cu risc sunt cei cu neoplazii leucocitare, cu limfom, pacienții SIDA în stadiile tardive ale evoluției, cei cu transplant de măduvă osoasă, cei tratați cu corticosteroizi. Hifele invadează endoteliul şi lumenul vascular şi produc tromboze, infarct şi necroză tisulară. Din plămân, infecția se disemineză pe cale sanguină în tractul gastro-intestinal, în rinichi, în creier etc., producând abcese şi leziuni necrotice. În absența tratamentului adecvat, cu itraconazol sau cu amfotericină B, aspergiloza invazivă evoluează rapid şi este letală.

Factorii de virulență ai fungilor invazivi sunt numeroşi: cei mai importanți sunt *proteazele.* Proteazele degradează materia organică vegetală şi animală în mediul extern, dar şi țesutul conjunctiv elastic pulmonar. *A. fumigatus* secretă o serin-protează şi o metalo-protează. *Aspergillus* sp. produce catalază, ce descompune H_2O_2 proprie, dar şi H_2O_2 produs în 'explozia metabolică' a fagocitelor. Asocierea aspergilozei cu CGD (boala cronică granulomatoasă) este dovada rolului catalazei ca factor de virulență. Neutrofilele pacienților cu CGD nu sunt capabile de explozia metabolică şi de aceea sunt sensibili la infecții cu patogeni pozitivi pentru catalază.

A. fumigatus produce *gliotoxina,* cu proprietăți toxice şi imunosupresoare cu spectru larg: inhibă activitatea fagocitară şi induce apoptoza macrofagelor, inhibă activarea limfocitelor T.

A. flavus produce aflatoxine, cu efect carcinogen.

Hifele de *A. fumigatus* activează calea alternativă a C, în serul uman normal: C3b şi C3bi se depun pe suprafața hifelor şi le opsonizează, uşurând ingestia de către fagocite.

La persoanele imunocompromise şi în condiții experimentale, la animalele tratate cu corticosteroizi, capacitatea macrofagelor de a elimina agentul fungic invadator diminuează şi inoculul nu mai este anihilat. În plămân, conidiile germinează şi formează hife, care au tendința să invadeze alveolele şi vasele de sânge. Hifele invadează endoteliul şi lumenul vascular şi produc tromboze, infarct şi necroză tisulară. Din plămân, infecția se disemineză pe cale sanguină în tractul gastro-intestinal, în rinichi, în creier etc., producând abcese şi leziuni necrotice. În absența tratamentului adecvat, cu itraconazol sau cu amfotericină B, aspergiloza invazivă evoluează rapid şi este letală.

Mecanisme de apărare antifungică. Majoritatea conidiilor inhalate sunt reținute în tractul respirator superior. Secreția mucoasă şi cilii celulelor epiteliale elimină conidiile prin înghițire în tractul digestiv. Când ajung în țesutul pulmonar, macrofagele alveolare – prima linie de apărare a organismului – fagocitează conidiile, nu le omoară, dar împiedică germinarea lor. În serul pacienților se sintetizează IgG şi IgE la titruri crescute. Formarea granulomului pulmonar cu infiltrat limfocitar, este dovada imunității celulare la pacienții cu ABPA.

Probele de analizat sunt sputa, biopsia țesutului pulmonar.

Diagnosticul este îngreunat de faptul că *Aspergillus* este un contaminant frecvent al materialului analizat. Detectarea hifelor tipice, ramificate dichotomic, de aceeaşi grosime, în preparatul primar din spută, din biopsii şi creşterea în culturi repetate argumentează diagnosticul.

Antigenele de *Aspergillus* (galactomananul) se detectează cu particule de latex tapetate cu AMC într-o reacție de aglutinare.

Evidențierea anticorpilor serici este o metodă de diagnostic, într-o reacție cu antigene fungice reprezentate de extracte miceliene sau de produşi metabolici secretați în mediul de creştere. Nu sunt disponibile preparate antigenice standardizate pentru diagnosticul imunologic al maladiilor induse de

Aspergillus. Componentele chimice ale preparatelor antigenice diferă (filtratul culturii sau extractul micelian). Antigenele fungice sunt proteine, polizaharide sau glicoproteine. Testele serologice se folosesc pentru diagnosticul variatelor tipuri de aspergiloză la pacienții imunocompetenți. La cei imunosupresați, nu se detectează anticorpi. În acest caz, pentru diagnostic trebuie detectat antigenul.

Imunodifuzia este cea mai folosită pentru diagnosticul aspergilozei, dar nu are sensibilitate deoarece antigenele solubile precipită la titru relativ crescut al anticorpilor şi nu dă informații cantitative despre concentrația anticorpilor serici. Antigenul este preparat din extractul fungic sau din filtratul culturii.

Aspergiloza se tratează cu doze mari de *Aspergillus* şi cu compuşi azolici.

Fig. 486. Cultură de *Paecilomyces lilacinus,* cu pigment de nanță deschisă, caracteristic hialohifomicetelor (Mycology online, www.mycology.adelaide.edu.au).

Acremonium cuprinde 100 de specii, dintre care unele sunt recunoscute ca agenți oportunişti la om şi animale, fiind agenți ai hialohifomicozelor (artrită, osteomielită, peritonită, endocardită, pneumonie, infecții cerebrale şi subcutanate). Speciile de *Fusarium* produc keratite micotice, onicomicoze, hialohifomicoze (cutanate, subcutanate, endoftalmite, artrite, osteomielite) la arşi, consecutiv unor leziuni traumatice, la dializați).

Geotrichum candidum este agentul geotrichozei, cu afectare pulmonară, dar şi orală, bronhială, vaginală, cutanată şi digestivă.

Onychocola canadensisi şi *Scopulariopsis* produc ocazional onicomicoza distală, laterală sau subunghială.

Paecilomyces (fig. 486) sunt agenți emergenți ai keratiei micotice şi ai hialohifomicozelor la pacienții imunodeprimați, la care aceasta poate îmbrăca diferite forme clinice: peritonita, endoftalmita, endocardita, pielonefrita, sinuzita şi leziunile cutanate.

Speciile de *Penicillium* sunt rar implicate în patogeneza umană, însă poate produce infecții oportuniste (artrite micotice, otomicoze, endocardite, infecții pulmonare sau sistemice) la pacienții dializați, SIDA (mai ales specia *P. marneffei*) sau la cei cu valve artificiale (Samson şi colab., 1984).

Trichoderma viride produce infecții pulmonare şi peritonite la dializați.

Zigomicozele (mucormicozele) este produsă din fungi clasificați în clasa *Zygomycetes*, saprobionți ubicvitari termotoleranți pe materia organică, relativ rar izolați în laboratorul clinic. Fungii care produc infecția la om sunt incluşi în două ordine: *Mucorales* şi *Entomophtorales*. Sunt fungi filamentoşi, cu hife neseptate delimitate de pereți groşi. Hifele se ramifică la unghi aproape drept. Se cultivă uşor pe mediul Sabouraud şi formează un miceliu aerian scămos. Persoanele cu risc de infecție fiind cele imunocompromise, iar speciile implicate în patologia umană sunt: *Rhizopus* (sp. *oryzae* = *R. arrhizus,* produce peste 60% dintre cazurile de zigomicoze, 90% fiind infecții rinocerebrale) (fig. 487), *Rhizomucor* (produce infecții cutanate, pulmonare, sistemice), *Mucor* (din cele peste 50 de specii, câteva specii termofile sunt implicate în infecții cutanate), *Apophysomyces elegans* (infecții invazive), *Conidiobolus coronatus* (infecții rino-faciale în zonele tropicale), *Cunninghamella bertholletiae* (infecții de plagă traumatică), *Absidia corymbifera* (produce infecții pulmonare, rinocerebrale, ale SNC, sistemice, cutanate), *Saksenaea vasiformis* (infecții diseminate posttraumatice, infecții rinocerebrale şi cutanate) etc. (Domsch şi colab., 1980; Ellis, 1997).

Sporangiosporii invadează căile aeriene, producând tromboza, infarctul şi necroza tisulară.

Mucoralele sunt agenți infecțioşi tipic *oportunişti*, care produc infecții numai la pacienții imunodeficitari sau cu maladii metabolice (diabet, neutropenie, terapie imunosupresoare de durată, administrarea cronică a prednisonului, terapia cu chelatori ai Fe, administrarea de lungă durată a antibioticelor cu spectru larg de acțiune, malnutriția severă, alterarea traumatică sau chirurgicală a integrității tegumentului, arsuri).

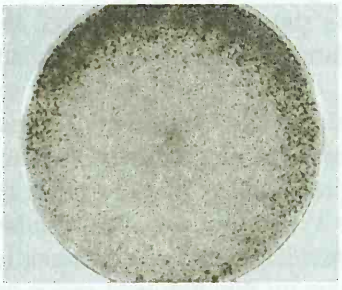


Fig. 487. Aspectul culturii de *Rhizopus* (Mycology online, www.mycology.adelaide.edu.au).

Zigomicoza apare rareori la persoanele imunocompetente. Cele mai frecvente localizări sunt infecțiile rinocerebrale și pulmonare, rareori gastro-intestinale.

Sporangiosporii invadează căile aeriene odată cu praful. Au afinitate mare pentru structurile vasculare, unde se dezvoltă, producând tromboza, infarctul și necroza țesuturilor implicate, mediată de proteazele, lipazele și de toxinele fungice.

Infecțiile se clasifică după manifestările clinice:

– mucormicoza rinocerebrală se disemineză din mucoasa nazală sau din sinusuri și poate să implice creierul. De cele mai multe ori este o consecință a acidozei diabetice;
– mucormicoza pulmonară se manifestă în special la neutropenici după tratamentul cu citostatice;
– mucormicoza gastro-intestinală apare rareori la copiii subnutriți;
– mucormicoza cutanată este consecința leziunilor tegumentare ample (arsuri);
– mucormicoza diseminată, consecutivă celei pulmonare.

Utilizarea deferoxaminei – chelator al metalelor – pentru tratamentul supraîncărcării organismului cu Fe sau Al se corelează intens cu mucormicoza.

Diagnosticul mucormicozei se pune după examenul microscopic și evidențierea hifelor fungice în țesutul infectat. Nu există metode de diagnostic serologic.

Amfotericina B este cel mai bun agent terapeutic pentru mucormicoze.

28.4. Terapia infecțiilor fungice

Cele mai multe micoze (tabelul 75) se tratează cu dificultate, deoarece fungii au un număr mare de gene și produse genice omologe cu ale gazdei umane și rămân puține ținte unice pentru agenții chimioterapeutici și pentru antibiotice. Infecțiile cutanate se tratează cu griseofulvină, itraconazol, miconazol, clotrimazol sau cu alți agenți antifungici cu aplicație locală. Majoritatea infecțiilor cu dermatomicete* se pot trata eficient cu *griseofulvina*, un antibiotic antifungic cu administrare orală de lungă durată (luni de zile), sintetizat de *Penicillium griseofulvum*. Griseofulvina se administrează local pentru tratamentul dermatomicozelor (infecțiile tegumentului, părului, unghiilor), pentru că se concentrează în celulele stratului cornos al epidermei, la valori inhibitoare pentru creșterea hifelor fungice. În hifele miceliene, griseofulvina interacționează cu proteinele microtubulilor, dezorganizează fusul mitotic și inhibă creșterea. Antibioticul este activ numai asupra hifelor care cresc. Este bine tolerată, cu efecte secundare minime.

* Testele de sensibilitate la antifungice pentru dermatomicete nu sunt încă standardizate, iar datele disponibile sunt limitate. Majoritatea cercetătorilor utilizează metodologia modificată corespunzătoare CLSI (M38P).
Terbinafin și itraconazolul sunt active față de *Microsporum*, însă în unele studii acesta este mai puțin sensibil la terbinafin. Terapia orală cu aceste antifungice este larg utilizată pentru tratamentul infecțiilor cu *Microsporum*.

Tabelul 75.

Infecții fungice localizate: agenți etiologici, produse patologice și diagnostic (Brooks și colab., 2007).

Infecție	Produs patologic	Teste de diagnostic
Micoze invazive		
Aspergiloză: *A. fumigatus*, alte specii de *Aspergillus*		
Pulmonară	Secreții de tract respirator	Dozarea galactomananului
Diseminată	Biopsie, sânge	Dozarea galactomananului Cultivare dificilă
Blastomicoză: *Blastomyces dermatiditis*		
Pulmonară	Secreții de tract respirator	Fixarea complementului Reacții imunoenzimatice Cultivare
Ulcere orale, cutanate	Biopsie, tampon	Fixarea complementului Reacții imunoenzimatice Cultivare Antigen urinar
Osoasă	Biopsie osoasă	Fixarea complementului Reacții imunoenzimatice Cultivare Antigen urinar.

Coccidioidomicoză: *Coccidioides immitis*		
Pulmonară	Secreţii de tract respirator	Fixarea complementului Reacţii imunoenzimatice Cultivare pe geloză sânge Imunoprecipitare Imunodifuzie Latex aglutinare Hibridizare ADN
Diseminată	Biopsie la situl infecţiei	Fixarea complementului Reacţii imunoenzimatice Cultivare pe geloză sânge Imunoprecipitare Imunodifuzie Latex aglutinare Hibridizare ADN.
Histoplasmoză: *Histoplasma capsulatum*		
Pulmonară	Secreţii de tract respirator	Fixarea complementului Imunodifuzie Evidenţierea antigenului în urină, ser, spălătură bronho-alveolară
Diseminată	Biopsie la situl infecţiei, măduvă osoasă, sânge	Fixarea complementului Imunodifuzie Evidenţierea antigenului în urină, ser, spălătură bronho-alveolară.
Nocardioză: *Nocardia asteroides*		
Pulmonară	Secreţii de tract respirator	Colorație Ziehl modificată
Subcutanată	Aspirat sau biospia abcesului	
Cerebrală	Biospie	
Paracoccidioidomicoză (blastomicoza sud americană): *Paracoccidioides brasiliensis*		
	Biopsie din leziune	Immunodifuzie, Fixarea complementului
Sporotrichoză: *Sporothrix schenckii*		
Noduli cutanaţi şi subcutanaţi	Biopsie	Aglutinare Cultivare
Diseminată	Biopsie	Aglutinare
Zygomicoză (phycomicoză, mucormicoză): *Rhizopus* sp., *Mucor* sp. etc		
Rinocerebrală	Ţesut nazo-orbital	Hife neseptate vizibile la microscop
Cutanată; pulmonară şi diseminată	Secreţii respiratorii, biopsie	Cultivare
Infecţii levurice		
Candidoză: *Candida albicans, C tropicalis, C parapsilosis, C glabrata*		
Mucoasă	Secreţii	Examinare directă la microscop Cultivare
Cutanată	Tampon	
Sistemică	Sânge, produs de biopsie, urină	Immunodifuzie, test cutanat
Criptococoză: *Cryptococcus neoformans*		
Pulmonară	Secreţii respiratorii	Detectarea antigenului rar pozitivă
Meningită	LCR	Detectarea antigenului în LCR
Diseminată	Măduvă osoasă, sânge, ţesut osos	Detectarea antigenului în ser
Infecţii pimare cutanate		
Dermatofitoză: *Microsporum* sp., *Epidermophyton* sp., *Trichophyton* sp.		
	Fire de păr, ţesut cutanat, unghii din zonele afectate.	

Agenţii antifungici disponibili pentru tratamentul infecţiilor micotice sistemice sunt limitate ca număr şi eficienţă (tabelul 76), deoarece fungii sunt organisme eucariote şi din punct de vedere biochimic se aseamănă cu organismul gazdă. Asemănarea face ca dezvoltarea unui medicament eficient faţă de agentul invadator, dar sigur pentru gazdă, să necesite un studiu de durată în cercetarea de bază şi în clinică.

Primul agent cu activitate antifungică (griseofulvina) a fost izolat în 1939, iar primul agent polienic antifungic, *nistatinul*, a fost descoperit în 1949.

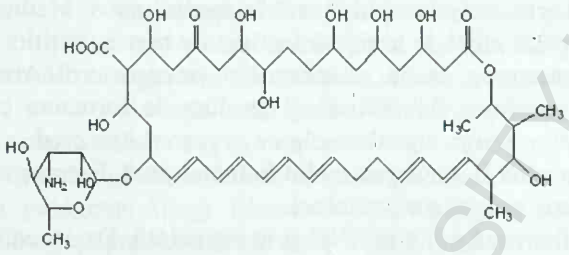
Clasele de medicamente disponibile pentru tratamentul infecţiilor fungice sunt:

– poliene (amfotericina B şi nistatinul;
– flucitozina, un analog pirimidinic;
– compuşii azolici şi alţi inhibitori ai sintezei ergosterolului;

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

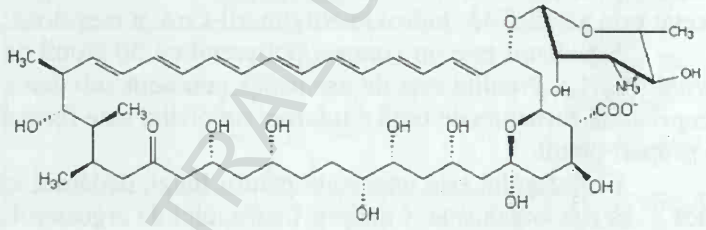
– echinocandidele, inhibitoare ale sintezei β-glucanului parietal;
– griseofulvina, inhibitoare a asamblării microtubulilor fusului de diviziune.

Polienele. Antibioticele polienice (nistatinul şi amfotericina B) se sintetizează pe o cale metabolică asemănătoare cu aceea a antibioticelor macrolide (eritromicina). Structural, macrolidele se caracterizează prin inele lactonice multiunitare, care poartă numeroşi substituienţi: grupări metil, hidroxil, glucide specifice şi cel puţin un grup carbonil. Subgrupul polienelor conţine o serie de legături duble (între 4 şi 7) conjugate. Prezenţa regiunilor foarte polare şi a celor nepolare în moleculele polienice le conferă caracterul *amfipatic*, ceea ce explică solubilitatea şi mecanismul de acţiune. Aciditatea se datorează grupării carboxil, iar caracterul bazic este conferit de micozamină, un glucid aminat izolat din nistatin şi amfotericina B.



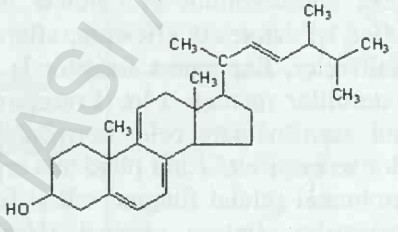
Structura moleculară a nistatinului

Mecanismul de acţiune. Medicamentele din clasa *polienelor*, în special *amfotericina B* (utilizată din 1960), au fost considerate cele mai eficiente dintre toţi agenţii antifungici cu administrare sistemică. Polienele sunt o clasă de medicamente cu acţiune selectivă numai asupra membranelor ce conţin *ergosterol:* de aceea sunt inhibitorii pentru fungi, dar nu sunt active faţă de bacterii. Acţiunea diferenţiată a permis relevarea unor diferenţe biochimice importante între bacterii şi fungi.

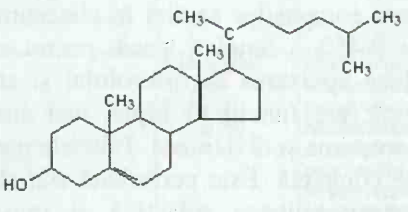


Structura moleculară a amfotericinei B

Majoritatea medicamentelor antifungice au ca ţintă molecula de *ergosterol*, sterolul major al membranei plasmatice a fungilor, analogul structural al *colesterolului* din celula mamiferelor (Hector, 1993).



Structura moleculară a ergosterolului



Structura moleculară a colesterolului

Ergosterolul din membrana fungică contribuie la o varietate de funcţii celulare: este sediul chitin-sintetazei, importantă pentru creşterea şi diviziunea celulei, este important pentru fluiditatea şi integritatea membranei.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Situsul acțiunii antibioticelor polienice este membrana citoplasmatică şi ca rezultat al legării polienelor îşi pierde funcția de barieră selectivă de permeabilitate. Medicamentele se *intercalează* în membrane şi formează un *canal*, prin care componentele celulare, în special ionii de K, părăsesc citoplasma şi alterează gradientul protonic al membranei. Oligomerii se formează prin asocierea monomerilor în conexiune cap-coadă, formându-se complexe suficient de lungi pentru a străpunge membrana şi să inducă efectele lezionale.

Sensibilitatea la polienе se manifestă şi la alte grupe de organisme: alge, protozoare (*Leishmania donovani*). Antibioticele polienice sunt relativ toxice pentru *eritrocitele* mamiferelor.

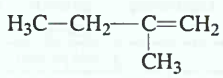
Amfotericina B este mai activă față de celulele fungice, decât față de cele mamaliene, datorită tipului de sterol încorporat în membrană. Amfotericina induce peroxidarea lipidelor din structura membranei, rezultatul fiind modificarea permeabilității. Amfotericina B este insolubilă în apă, iar pentru a deveni activă biologic, trebuie solubilizată în mediul apos. Medicamentul nu interacționează cu colesterolul, ceea ce explică efectele toxice selective ale concentrațiilor mici de amfotericină B, la care medicamentul este monomeric, asupra membranelor cu ergosterol. Amfotericina monomerică s-ar asocia cu ergosterolul în grosimea membranei şi ar duce la formarea canalelor transmembranare. Specificitatea medicamentelor pentru membranele cu ergosterol se crede că se datorează interacțiunii canalului format de amfotericina B, cu ergosterolul în membrană. Formarea canalelor oligomerice este condiționată de o concentrație prag a amfotericinei.

Amfotericina B penetrează puțin în SNC şi în articulații. De aceea se recomandă, pentru unele infecții, administrarea intraarticulară.

Reacțiile adverse acute la amfotericina B injectată intravenos, se manifestă la toți pacienții (febră, frisoane, dispnee, hipotensiune), iar cele cronice sunt de nefrotoxicitate.

Nistatinul, cu administrare locală, se foloseşte pentru tratamentul candidozei orale şi vaginale. Inhibă candidoza esofagiană şi gastro-intestinală după administrare orală, nu se absoarbe sistemic şi nu dă efecte secundare. Nu se administrează parenteral, deoarece este prea toxic.

Inhibitorii biosintezei ergosterolului. Compuşii azolici, alilaminele, tiocarbamații şi morfolinici se folosesc în tratamentul micozelor ca inhibitori ai căii de biosinteză a *ergosterolului*. Toate aceste medicamente interacționează cu enzimele implicate în sinteza ergosterolului din *squalen*, care este produs din acetat prin acetil-CoA, hidroximetilglutaril-CoA şi mevalonat.



Structura moleculară a grupului prenil

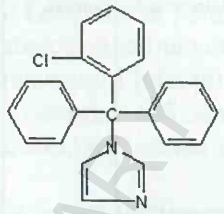
Squalenul este un compus poliprenil cu 30 atomi de C (conține 6 unități *prenil* (C_5H_8). Prenilul este de asemenea cunoscut sub denumirea de *izopren* sau *izoprenoid*. Structura de bază a tuturor steroizilor este formată prin condensarea a 6 grupări prenil.

Ergosterolul este important pentru fungi, deoarece este sterolul dominant în membrana plasmatică a acestor organisme. Cantități foarte mici de ergosterol sunt necesare pentru ca celulele să progreseze în ciclul celular.

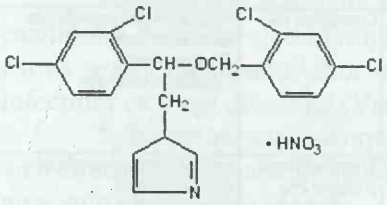
În 1969, doi compuşi propuşi de două laboratoare diferite au fost introduşi în clinică pentru tratamentul infecțiilor fungice: *clotrimazol* şi *miconazol*. A urmat *econazolul* (1974). Aceşti 3 compuşi azolici rămân cei mai importanți pentru terapia multor dermatomicoze.

Mecanismul de acțiune. Agenții azolici antifungici inhibă *sinteza ergosterolului*, prin inhibiția *lanosterol-demetilazei*, enzimă dependentă de citocromul P_{450}, denumită şi 14α-sterol-demetilază ($P\text{-}450_{DM}$). Aceiaşi enzimă are rol important în sinteza colesterolului în celulele mamiferelor. Administrarea compuşilor azolici în concentrații terapeutice îşi datorează eficiența, afinității lor mai mari pentru $P\text{-}450_{DM}$ fungică, decât pentru enzima mamiferelor. Expunerea fungilor la un compus azolic produce epuizarea ergosterolului şi acumularea sterolilor metilați 14α. Ergosterolul, pentru celula fungică, are funcții multiple, una dintre ele fiind asemănătoare celei hormonale, deoarece stimulează creşterea şi diviziunea. Efectele medicamentelor se manifestă când pierderea ergosterolului este aproape completă. Este perturbată atât structura membranei celulei fungice, cât şi funcțiile sale esențiale: permeabilitatea selectivă şi transportul nutrienților, sinteza chitinei (Hector, 1993). Rezultatul net este inhibiția creşterii fungice. Agenții azolici antifungici utilizați în clinică, conțin 2 sau 3 atomi de N în inelul azolic şi sunt clasificați ca *imidazoli* (de exemplu, ketoconazol, miconazol, clotrimazol) sau ca *triazoli* (itraconazol şi fluconazol). Cu excepția ketoconazolului, folosirea imidazolilor şi triazolilor este limitată la tratamentul micozelor superficiale. La concentrații mari, compuşii azolici pot să interacționeze direct cu lipidele membranare.

Clotrimazolul este activ, *in vitro*, față de dermatomicete, dar și față de unele bacterii Gram pozitive. În clinică se folosește pentru tratamentul infecțiilor fungice superficiale (tinea versicolor, infecții orale și vaginale cu *Candida*). Activitatea clotrimazolului, *in vitro*, este comparabilă cu a amfotericinei B. Este mai activ decât *griseofulvina* și *nistatinul*. Acționează asupra membranei celulei fungice, a cărei permerabilitate o perturbă.



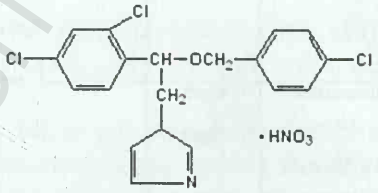
Structura moleculară a clotrimazolului



Structura moleculară a miconazolului

Miconazolul este un derivat fenetil-imidazol. Are toxicitate suficient de mică, astfel încât se administrează intravenos, pentru terapia infecțiilor fungice sistemice. Este eficace pentru tratamentul infecțiilor fungice superficiale: dermatomicoze, candidoză cutanată și vaginală.

Econazolul este un derivat antifungic imidazolic, cu o structură identică cu a miconazolului, deosebirea constând în absența unui atom de Cl pe un inel benzenic. Activitatea antifungică *in vitro* a econazolului este comparabilă cu a miconazolului: are spectru larg de activitate față de dermatomicete, *Candida* spp., alte levuri patogene, fungi filamentoși și unele bacterii Gram pozitive (Georgopapadakou și Walsh, 1996). S-a folosit pentru terapia locală a micozelor superficiale (tinea versicolor, candidoză cutanată). Nu este adecvat pentru administrare sistemică, deoarece se leagă stabil de proteinele serice.

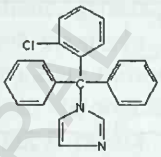
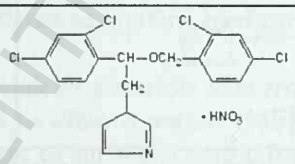
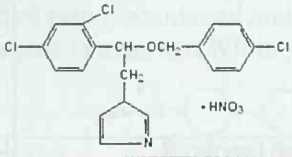
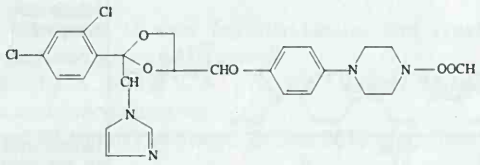
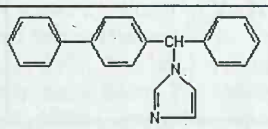


Structura moleculară a econazolului

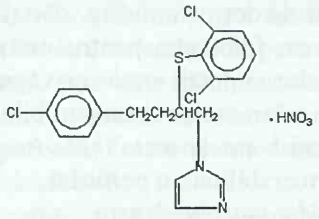
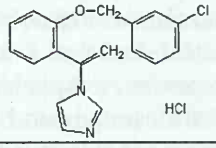
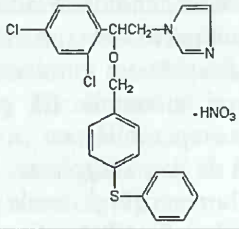
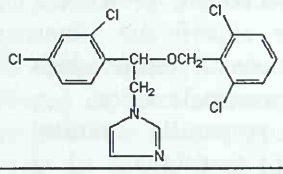
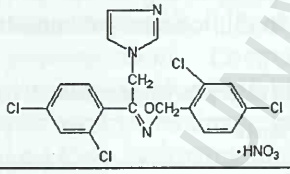
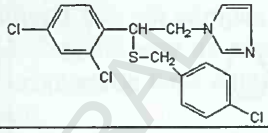
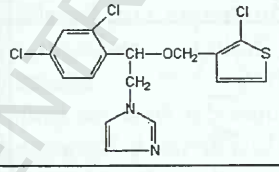
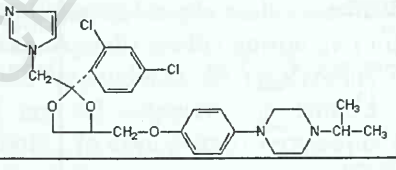
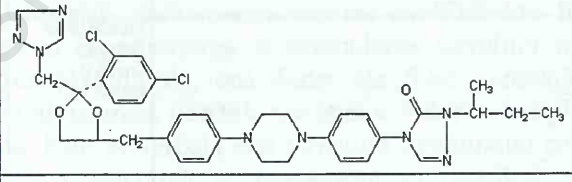
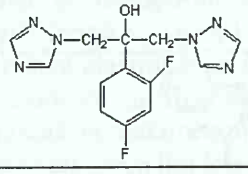
Denumirile generice și comerciale, structurile chimice, formulările și indicațiile privind imidazolii antifungici și a terconazolului, un derivat triazolic, utilizabili în clinică sunt prezentate în tabel.

Tabelul 76.

Principalii agenți terapeutici utilizați în infecțiile fungice (după Topley și Wilson's, 1998).

Denumire	Denumire comercială	Formulă chimică	Compoziție	Indicații terapeutice
Clotrimazol	Canesten Mycelex Mycelex – G Lotrimin Gyne-Lotrimin Fungoid		Tablete vaginale 100, 200, 500 mg. Tablete orale 10 mg. Creme și loțiuni 2%.	Infecții fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze vaginale.
Miconazol	Minostat Minostat-Derm Minostat i.v.		Soluție sterila parenterala 10 mg. Supozitoare vaginale 20 mg. Creme și loțiuni 2%.	Infecții fungice sistemice, coccidioidomicoze, candidoze, criptococcoze, paracoccidioido-micoze, pseudoallescherioze, candidoze cronice mucocutanate.
Econazol	Spectazol Pevaryl		Creme topice, vaginale, spray, pudre.	Infecții fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze vaginale.
Ketonazol	Nizoral Fungarol Fungarest Orifungal		Tablete orale 200 mg. Cremă și soluție 1%.	Infecții fungice sistemice, blastomicoze, anumite forme de coccidioidomicoze și histoplasmoze, candidoze mucocutanee cronice, paracoccidioido-micoze. **Nu sunt recomandate în meningite fungice,** Infecții cutanate superficiale, dermatomicoze, *Tinea* versicolor.
Bifonazol	Mycospor Mycosporan		Cremă și soluție 2%.	Infecții fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze cutanate.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Butaconazol	Femstat		Cremă vaginală 1%. Ovule vaginale 100 mg.	Candidoze vaginale.
Croconazol	Pilzein		Cremă/gel 1%.	Infecţii fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, Candidoze cutanate
Fenticonazol	Lomexin		Creme vaginale şi topice 2%.	Infecţii fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze vaginale şi cutanate.
Isoconazol	Travogen Gyn-Travogen		Creme vaginale şi topice 2%.	Infecţii fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, Candidoze vaginale şi cutanate
Oxiconazol	Oceral Myfungar Gyno-Myfungar Okinazol Derimin		Creme, spray-uri, pudre 1%.	Infecţii fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze vaginale şi cutanate.
Sulconazol	Exelderm Sulcosyn		Creme 1%.	Infecţii fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze vaginale şi cutanate.
Tioconazol	Trosyd Gyn-Trosyd		Creme, pudre, loţiuni, spray 1%.	Infecţii fungice superficiale, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze vaginale şi cutanate.
Terconazol (trionazol)	Terazol Gyn-Terazol Fungistat		Creme vaginale 0.8%. Ovule vaginale 40, 80 mg.	Candidoze vaginale.
Itraconazol	Sporanox		Capsule orale 100 mg. Soluţie orala 10mg/ml.	Infecţii fungice superficiale şi sistemice inclusiv *tinea versicolor*, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze vaginale cutanate şi sistemice, aspergiloze sistemice, sporotrichoze, chromomicoze.
Fluconazol	Diflucan		Tablete orale 50, 10, 150, 200 mg. Suspensie orală 10, 40 mg/ml. Soluţie sterilă i.v. 2 mg/ml	Infecţii fungice superficiale şi sistemice inclusiv *tinea versicolor*, dermatomicoze, *Tinea versicolor*, candidoze vaginale cutanate şi sistemice. **Indicate special în meningite fungice.**

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ketoconazolul este un derivat imidazolic antifungic, activ pe cale orală. Este indicat pentru tratamentul blastomicozei, histoplasmozei diseminate. Acţiunea sa este fungistatică şi eliminarea infecţiei necesită o activitate normală a funcţiei imunitare. Este eficient pentru tratamentul infecţiilor fungice superficiale. Studiile dublu-orb (placebo şi medicament) au evidenţiat eficienţa medicamentului în tratamentul tinea versicolor. Reacţiile adverse, limitante ale dozei, sunt starea de rău general şi voma.

Fluconazolul este activ faţă de *C. albicans in vitro* şi *in vivo* şi s-a folosit pentru tratamentul candidozei cutanate şi orofaringiene. Deoarece administrarea orală este avantajoasă, utilizarea s-a extins pentru tratamentul altor infecţii fungice: criptococoza, histoplasmoza, coccidioidomicoza şi a infecţiilor cu fungi dimorfici (Van Etten şi colab., 1991).

5-flucitozina este încorporată în celulă de o citozin-permează şi dezaminată în 5-fluorouracil, de o citozin-dezaminază. 5-fluocitozina are acţiune specific antifungică, deoarece celulele mamiferelor nu conţin citozin-dezaminază.

Mecanismul primar de acţiune al compuşilor azolici constă în inhibiţia biosintezei ergosterolului, componentă esenţială a membranei citoplasmatice a fungilor, rezultatul fiind acumularea lanosterolului sau a altor intermediari sterolici.

Activitatea antifungică primară de inhibiţie a biosintezei ergosterolului membranar tinde să fie o acţiune fungistatică şi nu fungicidă. De aceea, derivaţii azolici antifungici necesită activitatea funcţiei imunitare pentru a elimina fungii invadatori.

Flucitozina (5-fluorocitozina) este derivatul fluorurat al citozinei, un agent antifungic inhibitor pentru speciile de levuri. Este convertită în celula fungică la 5-fluorouracil, care inhibă timidilat-sintetaza, producând un deficit al timinei şi al sintezei ADN. Este eficientă pentru tratamentul infecţiilor *dematiaceae* (cele care produc pigmenţi şi leziuni tegumentare colorate) şi are o penetrare bună, chiar în SNC.

Griseofulvina, un antibiotic cu administrare orală de lungă durată (luni de zile), sintetizat de *Penicillium griseofulvus* se foloseşte pentru tratamentul dermatomicozelor (infecţiile tegumentului, părului, unghiilor). După aplicare locală, este puţin absorbită şi concentrată în stratul cornos al epidermei, unde inhibă creşterea hifală. După administrare orală, griseofulvina se acumulează în ţesuturile keratinizate. În hifele miceliene, griseofulvina interacţionează cu proteinele microtubulilor, dezorganizează fusul mitotic şi inhibă creşterea. Antibioticul este activ numai asupra hifelor care cresc. Este bine tolerată, cu efecte secundare minime.

Cauza comună a rezistenţei se datorează unei tulpini fungice sensibilă la o concentraţie minimă inhibitorie (CMI) mai mare decât media. Alte cauze ale rezistenţei sunt modificarea căii de biosinteză a ergosterolului, scăderea acumulării medicamentului în celula fungică, acţiunea pompelor de eflux.

Pompele de eflux ale celulelor eucariote sunt *transportori ABC* (ATP binding cassette), cu rol în efluxul substanţelor toxice şi *facilitatori majori* (MF). Ultimii au rol în efluxul moleculelor relativ hidrofobe (tetraciclina) şi folosesc ca sursă de energie forţa proton motrice (gradientul transmembranar de H^+. În general, MF funcţionează prin mecanismul antiport, adică protonii sunt pompaţi în celulă, iar moleculele substratului sunt pompate la exterior (White şi colab., 1998).

Bibliografie

Ahmed K. 2009. Pityriasis Versicolor :Fungal Infection,Causes and Treatment. http://www.neelscorner.com/pityriasis-versicolor-fungal-infectioncauses-and-treatment/

Brooks G. F., Caroll K. C., Butel J. S., Morse S. A. eds. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition http:// www.accessmedicine.com

CliffsNotes. com. *Structure and Physiology of Fungi*. 29 Dec 2010 <http://www.cliffsnotes.com/study_guide/topicArticleId-8524,articleId-8452.html>.

Cummings R. D., Doering T. L. 2009. Chapter 21. Fungi in Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY):

De Hoog, G. S., Hermanides-Nijhof E. J., 1977. The black yeasts and allied hyphomycetes. Studies in Mycology No. 15. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.

Domsch, K. H., Gams W., Anderson T. H., 1980. Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic Press, London, UK.

Edison, L, Latimer K. S., Bain P. J., Roberts R. 2003. Canine and Feline Histoplasmosis. Veterinary Clinical Pathology Clerkship Program

Eisenberg L. G., Goldman W. E. 1991. *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis Clin. Microbiol. Rev. 4: 411–421.

Ellis, D. H. 1997. Zygomycetes. Chapter 16 In Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th edition Edward Arnold London pp247–277.

Fisher M. C., Koenig G. L., White T. J., Taylor L. W. 2002. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. Mycologia 94(1): 73–84.

Georgopapadakou N. H., Walsh T. J. 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies, Antimicrob. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 40: 279–291

Gregory M. J. 2006. Biology Web. http://faculty.clintoncc.suny.edu/faculty/michael.gregory/

Griffith, H. Winter. 1995.Complete Guide to Symptoms, Illness & Surgery. Putnam Berkely Group

Guillot, J., E Gueho, M. Jesourd et al. 1996. Identification of Malassezia species. J. Mycol. Med. 6:103–110.

Hector R. F. 1993. Compounds active against cell walls of medically important fungi. Clinical Microbiology Reviews. 6(1): 1–21.

http://hardinmd.lib.uiowa.edu/cdc/athletesfoot.html

http://phil.cdc.gov/ Public Health Image Library (PHIL)] -- image #3935

http://supercurso.sld.cu/supercursos/plonearticlemultipage.2006-05-05.8777394061/tinea-unguium

http://supercurso.sld.cu/supercursos/plonearticlemultipage.2006-05-05.8777394061/tinea-corporis/tinea-cruris//tinea-barbae)

http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Dermatophytes/Trichophyton/mentagrophytes.html

http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Dermatophytes/Epidermophyton/

http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Dermatophytes/Microsporum/Microsporum_gypseum.html

http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Madurella/mycetomatis.html)

Kreger-Van Rij, N.J.W. (ed) 1984. The Yeasts: a taxonomic study. 3rd Edition. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands.

Kwon-Chung, K. J., Bennett J. E., 1992. Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia and London.

Lam. S. 2008. Tinea capitis explained. Lam Institute for hair restauration. http://www.hairtx.com/hair-loss/hair-loss-disorders/tinea-capitis/

McGinnis, M. R. 1980. Laboratory handbook of medical mycology. Academic Press, London, UK.

Mochizuki, T. Pathogenic Fungi Database(PFDB), http://timm.main.teikyo-u.ac.jp/pfdb

Naglik J. R., Challacombe S. J., Hube B. 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev 67: 400–428.

Naglik J. R., Rodgers C. A., Shirlaw P. J., Dobbie J. L., Fernandes-Naglik L. L., Greenspan D. et al. 2003. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. J Infect Dis 188: 469–479.

Porter, C. *Aspergillus* in SOIL MICROBIOLOGY. BIOL/CSES 4684

Rebell, G., Taplin. D. 1970. The Dermatophytes. 2nd. revised edition. University of Miami Press, Coral Gables, Florida. USA.

Reid B. J. 1998. *Exophiala werneckii* causing tinea nigra in Scotland. Br. J. Dermatol. 139 (1): 157–8.

Rippon, J. W. 1988. Medical Mycology. 3rd Edition. W.B. Saunders Co.

Samson, R.A., E.S. Hoekstra, and C.A.N. van Oorschot. 1984. Introduction to food-borne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.

SparkNotes Editors. "SparkNote on Fungi." SparkNotes LLC. n.d.. http://www.sparknotes.com/biology/microorganisms/fungi/ (accessed December 16, 2010)

Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Vol. I , II. 1998. Ed. Lesslie Collier, A. Balows, M. Sussman.

Van Etten E. W., van de Rhee N. E., van Kampen K. M., Bakker-Woudenberg I. A. 1991. Effects of amphotericin B and fluconazole on the extracellular and intracellular growth of *Candida albicans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 35(11): 2275–2281.

Volk. T, Mossman T. 2005. Tom Volk's Fungus of the Month for January 2005. http://TomVolkFungi.net

Volk. T. 2001. Tom Volk's Fungus of the Month for January 2001. http://TomVolkFungi.net

Volk. T. 2002. Tom Volk's Fungus of the Month for January 2002. http://TomVolkFungi.net

Weitzman J. Summerbell R. C. 1995. The dermatophytes – Clin. Microbiol. Rev. 8: 240–259.

White T. C., Marr K. A., Bowden R. A., 1998. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance – Cli. Microbiol. Rev. April 11: 382–402.

Xavier M. H., Ribeiro L. H., Duarte H., Saraça G., Souza A. C. L. 2008. Dermatoscopy in the diagnosis of tinea nigra. Dermatology Online Journal 14 (8): 15.

BCU MATEUS PAIVA UNIVERSITY LIBRARY

Prescurtări

Ac	= anticorpi
ADCC (antibody dependent cell cytotoxicity)	= citotoxicitate dependentă de anticorpi
AGMK (African green monkey kidney)	= rinichi de maimuță verde africană
ALT	= alanin-aminotransferază
AMPc	= adenozin-monofosfatul ciclic
AST	= aspartat-aminotransferază
ATL	= leucemia adultului cu celule T
B	= bazofile
BIV	= virusul imunodeficienței bovinelor
CAEV	= virusul artritei și encefalopatiei caprinelor
CD	= celulă dendritică
CDI	= celule dendritice interstițiale
CDm	= celule dendritice mieloide
CDp	= celule dendritice plasmocitoide
CDU	= celule diploide umane
CHC	= carcinom hepatocelular
CI	= complexe imune
CMD	= cardio-miopatie dilatativă
CMV	= virusul citomegalic
CPA	= celule prezentatoare de antigen
cp	= citopatic
CRS	= sindromul congenital al rubeolei umane
dc	= dublu catenar
DI	= virioni defectivi interferenți
E	= eozinofile
EBNA (Epstein Barr nuclear antigen)	= antigenul nuclear al virusului Epstein Barr
ECM	= matrice extracelulară
ECP	= efect citopatic
EF	= electroforeză
EGF (epidermal growth factor)	= factorul de creștere al celulelor epidermice
EIAV	= virusul anemiei cronice recurente a equinelor
Ek	= celule eucariote
EMR	= endocitoză mediată de receptori
FGF (fibroblast growth factor)	= factorul de creștere al fibroblastelor
FIV	= virusul imunodeficienței felinelor
FSH	= hormonul foliculo-stimulator
gsi	= gastro-intestinal
GST	= gene supresoare ale creșterii tumorale
HA	= hemaglutinină
HAI	= reacția de hemaglutinoinhibare
HNIG	= human nonspecific IgG (IgG umană nespecifică)
HIV	= virusul imunodeficienței umane
HPV	= virusul papiloma uman
HRIG	= imunoglobulină antirabică umană
HSV	= herpes simplex virus
HTLV	= human T lymphotropic virus
ic	= intracerebral
ICNV	= comitetul internațional pentru nomenclatura virusurilor

SCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IDDM	= diabetus melitus insulino-dependent
IFA	= anticorpi imunofluorescenți
IFD	= imunofluorescență directă
IFN	= interferoni
Ig	= imunoglobuline
IG	= fracția γ a serului
IGF-1 (insulin-like growth factor 1)	= factorul de creştere asemănător insulinei
IMC	= imunitate mediată celular
IMH	= imunitate mediată humoral
IRES (internal ribosome entry site)	= situs intern de intrare a ribosomilor
iv	= intravenos
IVIG	= preparatul fracției γ a serului pentru administrare intravenoasă
LCMV	= virusul coriomeningitei limfocitare
LCR	= lichid cefalorahidian
LTR (Long Terminal Repeats)	= secvențe lungi repetate terminal
MALT	= țesut limfoid asociat mucoaselor
mc	= monocatenar
MBL (manose binding lectin)	= lectina care leagă manoza
MC	= moluscum contagiosum
MCV	= virusul moluscum contagiosum
MI	= mononucleoză infecțioasă
ME	= microscopie electronică
MO	= măduva osoasă
N	= neutrofile
NA	= neuraminidază
ncp	= necitopatic
NK (natural killer)	= celule ucigaşe naturale
NSin	= nesincițiale
NP	= nucleoproteină
nt	= nucleotide
OLS	= organe limfoide secundare
ORF (open reading frame)	= cadru deschis de citire
PDGF (platelet derived growth factor)	= factorul de creştere derivat din plachete
PKR	= fosfokinaza dependentă de ARN
PAMP (pathogen associated molecular patterns)	= tabloul molecular asociat patogenilor
PHA	= fitohemaglutinină
PRP	= panencefalita rubeolică progresivă
PRR (pattern recognition receptors)	= tabloul receptorilor de recunoaştere
Rb	= retinoblastom (tumoră retiniană la vârsta copilăriei)
ren	= reticul endoplasmic neted
reg	= reticul endoplasmic granular
RFC	= reacția de fixare a complementului
RI	= răspunsul imun
RIMH	= răspunsul imun mediat humoral
RIMC	= răspunsul imun mediat celular
RNP	= ribonucleoproteină
ROI	= radicalii reducerii intermediare a oxigenului
SARS	= sindromul acut respirator sever
SCID	= imunodeficiență severă combinată
SFM	= sistemul fagocitar mononuclear
SI	= sistemul imunitar
Sin	= sincițiale
SIV	= virusul imunodeficienței maimuțelor
SLAM	= moleculă specifică a activării limfocitelor
SNC	= sistem nervos central
TGFb (transforming frowth factor b)	= factorul b stimulator al creşterii celulelor transformate malign
TLR	= Toll like recetors
Tm (melting temperature)	= temperatura de denaturare a ADN dublu catenar

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TNF	= factorul de necroză tisulară (tumorală)
Toll	= proteină transmembranară cu secvențe extracelulare repetitive bogate în leucină şi un domeniu intracelular
ts	= termosensibil
VEB	= virsusul Epstein Barr
VEJ	= virusul encefalitei japoneze
VHA	= virusul hepatitei A
VHB	= virusul hepatitei B
VHC	= virusul hepatitei C
VRS	= virusul respirator sincițial
VSR	= virusul sarcomului Rous
VZV	= virusul varicela zoster

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Biblioteca Centrală Universitară
BIBLIOTECA DE BIOLOGIE
Cota veche 45 | Prețul lei

Tiparul s-a executat sub c-da nr. 3668/2015
la Tipografia Editurii Universităţii din Bucureşti

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ISBN 978-606-16-0600-9

LON 45